

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



Proyecto Especial de Graduación
Efecto de la suplementación con colina en el medio de cultivo *in vitro* sobre
el contenido lipídico de embriones bovinos preimplantados en tres fases
diferentes de desarrollo

Estudiante

Samuel Hincapié Montoya

Asesores

John Jairo Hincapié, D.Sc.

Peter J. Hansen. Ph.D.

Honduras, agosto 2024

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

ANA M. MAIER ACOSTA

Secretaría General a.i.

Agradecimientos

A todo el equipo del Laboratorio de Embriones Bovinos de la Universidad de Florida.

Al Dr. Peter J. Hansen por su asesoría y apoyo financiero en el presente proyecto.

Al M.Sc. Masroor Sagheer y M.Sc. Camila Cuellar por su asesoría y ayuda.

Contenido

Agradecimientos	3
Índice de Cuadros	7
Índice de Anexos	9
Resumen	10
Abstract	11
Introducción	12
Materiales y Métodos	15
Localización	15
Diseño Experimental	15
Materiales	16
Equipos y Reactivos.....	16
Soluciones	16
Solución Madre DPBS.....	16
Solución de Trabajo DPBS/PVP	17
Solución Madre de BODIPY 493/503	17
Solución de Trabajo de BODIPY 493/503	17
Hoescht 33342	17
Etanol	17
Día -1	18
Recolección de Ovarios	18

Acondicionamiento de los Ovarios	18
Recolección de los Ovocitos.....	18
Día 0	21
Fertilización in vitro (FIV)	21
Acondicionamiento del Semen por Centrifugación en Gradientes PureSperm® 40% - 80%.....	22
Descongelación del Semen	22
Día 1	23
Cultivo in vitro	23
Preparación de los Tratamientos	24
Colección y Fijado de Embriones	25
Inmunotinción.....	25
Montaje de Placas.....	26
Tratamientos	26
Mediciones y Análisis	26
Variables Analizadas	27
Resultados y Discusión.....	28
Rendimiento del PIV	28
Máxima intensidad de fluorescencia	31
Área Embrionaria	32
Media de fluorescencia.....	34
Conclusiones	39

Recomendaciones.....40

Referencias.....41

Anexos.....44

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Diseño Experimental: tratamientos, horas de cultivo y número mínimo de embriones por repetición.	16
Cuadro 2 Composición del medio de lavado HEPES-TALP.	20
Cuadro 3 Composición del medio de maduración (OMM).	21
Cuadro 4 Composición del medio de fertilización IVF-TALP.	22
Cuadro 5 Composición del medio de cultivo SOF-BE2.	24
Cuadro 6 Concentración de la suplementación con cloruro de colina en el medio de cultivo <i>in vitro</i> SOF-BE2 de embriones.	26
Cuadro 7 Índices de interés recolectados durante el proceso de PIV por cada repetición.	30
Cuadro 8 Número de embriones inmunoteñidos vs número embriones analizados.	30
Cuadro 9 Media de la máxima intensidad de fluorescencia general utilizando colina en medio de cultivo <i>in vitro</i>	31
Cuadro 10 Media de la máxima intensidad de fluorescencia (UA) por tiempo de colección (horas) y número de células utilizando colina en medio de cultivo <i>in vitro</i>	32
Cuadro 11 Media del área embrionaria general utilizando colina en el medio de cultivo <i>in vitro</i>	33
Cuadro 12 Media del área embrionaria (μm^2) por tiempo de colección y número de células utilizando colina en medio de cultivo <i>in vitro</i>	34
Cuadro 13 Media (Max intensidad de fluorescencia / área embrionaria) general utilizando colina en el medio de cultivo <i>in vitro</i>	35
Cuadro 14 Promedio de la media de fluorescencia por tiempo de colección y número de células utilizando colina en medio de cultivo <i>in vitro</i>	35
Cuadro 15 Media /Área general utilizando colina en el medio de cultivo <i>in vitro</i>	38
Cuadro 16 Media /Área por tiempo de colección y número de células utilizando colina en medio de cultivo <i>in vitro</i>	38

Índice de Figuras

Figura 1 Tendencia de los indicadores de calidad y eficiencia del proceso de PIV por cada repetición	28
Figura 2 Imágenes representativas de gotas lipídicas citoplasmáticas teñidas con BODIPY 493/503 en embriones de 4, 8 y >10 células cultivados en tratamiento control o en medio suplementado con 1.8 mM de colina	30
Figura 3 Contenido de lípidos de acuerdo con la media de fluorescencia según la etapa de desarrollo embrionaria (número de células) en embriones del tratamiento control y suplementados con colina en medio de cultivo <i>in vitro</i>	36

Índice de Anexos

Anexo A Ingredientes y cantidades requeridos para la preparación de la solución base del medio de lavado HEPES – TALP.....	44
Anexo B Ingredientes y cantidades requeridos para la preparación de la solución base del medio de fertilización IVF - TALP.	45
Anexo C Ingredientes y cantidades requeridos para la preparación de la solución base del medio de cultivo SOF-BE2.	46

Resumen

La colina es un micronutriente vital para la formación de fosfolípidos y betaína. El presente estudio tuvo como objetivo determinar los efectos de la suplementación de 1.8 mM de colina en el medio de cultivo *in vitro* sobre el contenido lipídico de embriones en tres diferentes fases de desarrollo embrionario (4, 8 y >10 células) en tres tiempos de colección después de fertilización (38, 51 y 63 horas), respectivamente. Se analizaron 164 embriones entre los dos tratamientos, 98 para el medio de cultivo SOF-BE2 + 1.8 mM de colina y 66 para el medio de cultivo SOF-BE2 (control). Se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) en el tamaño de embriones, los suplementados con colina presentaron un área promedio de $265611 \mu\text{m}^2$ y los del tratamiento control $251930 \mu\text{m}^2$, siendo los embriones suplementados con colina un 5.16% más grandes con base en el área embrionaria, aun así, no hubo diferencias ($P > 0.05$) entre los tratamientos y la etapa de desarrollo del embrión. No existieron diferencias ($P > 0.05$) en la máxima intensidad de fluorescencia entre tratamientos ni etapas de desarrollo. La media de fluorescencia (contenido de lípidos) no presentó diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos; pero, hubo diferencia ($P \leq 0.05$) en la acumulación de lípidos en embriones de ocho células entre tratamientos. Embriones de ocho células suplementados con colina tuvieron 26% menos lípidos que los embriones del tratamiento control. Se usó el indicativo de la relación entre la media de fluorescencia y el área para confirmar los resultados, donde se obtuvo diferencia ($P \leq 0.05$) en la misma etapa de desarrollo entre tratamientos. Se concluye que la suplementación con colina genera una reducción del contenido lipídico en embriones en la etapa de desarrollo de ocho células y se puede deber a la activación del genoma embrionario ligado a la participación de colina en la formación de fosfolípidos presentes en esta misma etapa de desarrollo.

Palabras clave: Betaína, embrión, fosfolípidos, gotas lipídicas, inmunotinción, producción *in vitro*.

Abstract

Choline is a vital micronutrient that is used for the formation of phospholipids and betaine. This study aimed to determine the effects of 1.8 mM choline supplementation in *in vitro* culture medium on the lipid content of embryos at three different stages of embryonic development (4, 8 and >10 cells) at three collection times after fertilization (38, 51 and 63 hours), respectively. A total of 164 embryos were analyzed between the two treatments, 98 for SOF-BE2 + 1.8 mM choline culture medium and 66 for SOF-BE2 culture medium (control). There were differences ($P \leq 0.05$) in embryo size, those supplemented with choline presented an average area of $265611 \mu\text{m}^2$ and the control treatment $251930 \mu\text{m}^2$, being the embryos supplemented with choline 5.16% larger based on embryo area. Even so, there were no differences ($P > 0.05$) between treatments and embryo development stage. There were no differences ($P > 0.05$) in maximum fluorescence intensity between treatments and developmental stage. Mean fluorescence (lipid content) showed no difference ($P > 0.05$) between treatments; however, there was difference ($P \leq 0.05$) in lipid accumulation in 8-cell embryos between treatments. The 8-cell embryos supplemented with choline had 26% less lipids than the control treatment embryos. The indicative of the ratio of mean fluorescence to area was used to confirm the results, where difference ($P \leq 0.05$) was obtained at the same developmental stage between treatments. It is concluded that choline supplementation generates a reduction of lipid content in embryos at the 8-cell stage of development and may be due to the activation of the embryonic genome linked to the participation of choline in the formation of phospholipids present at this same stage of development.

Keywords: Betaine, embryo, *in vitro* production, immunostaining, lipid droplets, phospholipids.

Introducción

El interés en técnicas biotecnológicas que contribuyan a la mejora en la productividad en los sistemas de producción animal ha incrementado en las últimas décadas, ya que, con la creciente demanda y competencia del mercado surge como necesidad la mejora de los mecanismos de producción. El principal objetivo de utilizar biotecnologías en la ganadería radica en la necesidad de intensificar el mejoramiento y multiplicación de razas e individuos sobresalientes genéticamente. El uso de la fertilización *in vitro* (FIV) permite acelerar los procesos reproductivos, además, estudiar a profundidad técnicas de manipulación genética como conservación zoo genética y caracterización de genes de interés (Uffo, 2011).

Se han utilizado estrategias para mejorar el rendimiento reproductivo en vacas a través de la alteración de la composición nutricional de las dietas (Santos et al., 2008), lo que ha permitido explorar a su vez esos suplementos en medios artificiales para replicar procesos naturales dentro del laboratorio. El interés del uso de suplementos en el cultivo de embriones es cada vez mayor debido a que el medio de cultivo con algunos suplementos puede aumentar la tasa de preñez (Estrada et al., 2019), ya que, los embriones producidos *in vitro* tienen menos probabilidades de establecer el embarazo que *in vivo* (Ferraz et al., 2016).

La colina es un componente del metabolismo que tiene el potencial de funcionar como un agente de programación del desarrollo embrionario en el período preimplantacional. A su vez, es una amina cuaternaria con tres grupos metilo que es un precursor de la fosfatidilcolina y la acetilcolina que actúa como donante de metilo a través de la formación de metionina y S-adenosilmetionina. La colina fue uno de los componentes más identificados en el metaboloma (conjunto de metabolitos presentes en un tejido o célula en un momento determinado) del líquido uterino (Caudill, 2010); (Freedman et al., 2022; Glier et al., 2014; Tríbulo et al., 2019), situación que hace a esta molécula particularmente interesante como ingrediente en los medios utilizados dentro de la producción de embriones *in vitro*.

Además de su rol en la regulación genética y programación embrionaria, la colina es precursora de moléculas lipídicas importantes. La mayoría de las membranas están constituidas por fosfolípidos como la fosfatidilcolina y sus concentraciones y patrones de distribución influyen directamente en la crio-supervivencia embrionaria, la fluidez, la permeabilidad y el comportamiento de la fase térmica y el éxito del embarazo (Ghanem et al., 2014).

Los lípidos se almacenan en la célula como triacilgliceroles y ésteres de esteroides en orgánulos llamados gotas de lípidos o gotas lipídicas (LP) (Ibayashi et al., 2021). Las características del metabolismo lipídico podrían estar relacionadas con factores como la calidad y viabilidad del embrión (Ghanem et al., 2014; Milazzotto et al., 2020). Las gotas lipídicas son dinámicas y pueden cambiar en número, tamaño o posición dentro del citoplasma (Ibayashi et al., 2021).

Parece que tener una sobreabundancia de fosfolípidos resulta positivo para la crio-preservación. De hecho, el proceso de cultivo *in vitro* induce la acumulación de gotas lipídicas en los blastómeros, lo que da susceptibilidad y estimula el metabolismo oxidativo y la oxidación de ácidos grasos (Janati et al., 2022). Las mayores cantidades de gotas citoplasmáticas y su distribución en los lípidos de membrana de los embriones de FIV se relacionan con reducciones en la viabilidad y la capacidad de crio-supervivencia (Annes et al., 2019). Se ha sugerido que los embriones de PIV son menos resistentes a la congelación lenta (método de crio-preservación) que los embriones producidos *in vivo* debido a la mayor cantidad de lípidos presentes en los embriones de FIV (Abe et al., 2002). Las principales fuentes de energía embrionaria son los hidratos de carbono y los lípidos (Bradley et al., 2016).

El metabolismo energético en las primeras etapas y clivajes es lento, hasta que el embrión inicia la activación del genoma embrionario en la etapa celular 8/16 (Lima et al., 2018), entonces, se produce una demanda exponencial de energía cuando se inicia la diferenciación y proliferación celular, debido a la formación de blastocelo y eclosión (Milazzotto et al., 2022). En la etapa de blastocisto, la demanda de energía varía entre la masa celular interna (MCI) y el trofoblasto (TE)

(Chi et al., 2020), durante el desarrollo embrionario, la morfología y el número de gotas lipídicas (GL) pueden cambiar para almacenar más lípidos o las etapas secuenciales de embriogénesis (Ibayashi et al., 2021; Sudano et al., 2016). La distribución de las GL pueden reflejar el estado metabólico de un embrión (Lipinska et al., 2023).

Teniendo en cuenta lo anterior, el metabolismo de los lípidos internos del embrión cambia con respecto a la etapa de desarrollo del embrión. Los perfiles lipídicos del embrión en el primer y segundo clivaje mantienen estrecha relación con el perfil lipídico de los ovocitos madurados, sin embargo, en etapas entre 8 y 16 células, cuando ocurre la activación del genoma embrionario, el perfil lipídico cambia drásticamente (Andrade y Poehland, 2021).

Se han intentado diferentes estrategias de suplementación en medios de cultivo para reducir el contenido lipídico dentro de los embriones, usando compuestos tales como: trans-10 cis-12 ácido linoleico conjugado y L-carnitina, compuestos que hacen parte en rutas oxidativas de ácidos grasos (Zolini et al., 2019). Se ha demostrado que la suplementación *in vivo* de colina protegida para el rumen en vacas lecheras reduce el contenido de triacilglicerol en células del hígado y ayuda en la movilización de ácidos grasos en vacas con hígado graso (Arshad et al., 2023). Existen indicios de que suministrar colina en el medio de cultivo puede reducir el contenido de gotas lipídicas dentro del embrión por su función asociada al transporte de lípidos y expresión genética (Potts et al., 2023).

Dados los beneficios que se han mencionado con anterioridad al suministrar colina protegida para el rumen, y los roles vitales que cumple colina en rutas fisiológicas, se establecieron los siguientes objetivos con base en la suplementación de colina en medio de cultivo *in vitro*.

El objetivo de este estudio fue analizar y comparar los cambios en la acumulación de gotas lipídicas en embriones que fueron suplementados con colina (1.8 mM) en el medio de cultivo, con embriones que fueron cultivados en medio de cultivo tradicional (SOF-BE2), teniendo en cuenta que se colectaron embriones en tres etapas de desarrollo diferentes (4, 8 y >10 células) en tiempos de colección específicos después de fertilización (38, 51 y 63 horas), respectivamente.

Materiales y Métodos

Localización

El estudio se llevó a cabo entre febrero y abril de 2024 en las instalaciones del Laboratorio de Embriones Bovinos de la Universidad de Florida, ubicado en el Departamento de Ciencias Animales en la ciudad de Gainesville, Florida, USA. El proceso de FIV (Fertilización *in vitro*) se realizó dentro del espacio especializado de FIV del Laboratorio de Embriones Bovinos.

Diseño Experimental

Se utilizó un Diseño Experimental Completamente Aleatorio (DCA) con cinco repeticiones por tratamiento utilizando el modelo lineal generalizado (GLM). El experimento tuvo dos tratamientos (TRT1 - 1.8 Mm colina, TRT2 (Control) - 0 mM) que se midieron en tres diferentes estadios de desarrollo embrionario (4 células, 8 células, >10 células) correspondientes a tres tiempos diferentes de cultivo (38 h, 51 h, 63 h), respectivamente. Se realizaron cinco repeticiones del experimento. La cantidad de embriones asignados a un tratamiento en cada repetición fue dependiente de la calidad de los óvulos extraídos de ovarios de vacas faenadas, por consiguiente, la homogeneidad de los embriones y su calidad depende de factores externos al experimento, lo que influyó en el número de embriones colectados por repetición. No hubo igualdad numérica en los embriones analizados por repetición (Cuadro 1).

Cuadro 1

Diseño Experimental: tratamientos, horas de cultivo y número mínimo de embriones por repetición.

T1 (0 mM colina)	Horas en cultivo	Embriones	T2 (1.8 mM colina)	Horas en cultivo	Embriones
R1	38	2	R1	38	8
	51	1		51	3
	63	3		63	3
R2	38	5	R2	38	12
	51	6		51	9
	63	0		63	6
R3	38	4	R3	38	6
	51	2		51	6
	63	12		63	2
R4	38	3	R4	38	3
	51	1		51	7
	63	5		63	8
R5	38	8	R5	38	8
	51	8		51	10
	63	6		63	7
Total		66			98

Materiales**Equipos y Reactivos**

Placa de 96 espacios: BD Falcon®, cat. # 353912, o equivalente.

BODIPY 493/503: Thermo Fisher®.

Hoescht 33342: Sigma-Aldrich®, cat. # B2261.

Reactivo antifade ProLong® Gold: Sondas moleculares Invitrogen, cat. # P36934.

Microscopio de fluorescencia: Microscopio fluorescente configurado con excitación 400-500 nm y emisión 515 nm.

Soluciones**Solución Madre DPBS**

Para preparar 100 mM PO₄ pH 7.4, añadir fosfato sódico monobásico (Solución 1a) a 300 mL al fosfato de sodio dibásico hasta que el pH alcance 7.4. Aproximadamente, 100 mL de fosfato sódico monobásico se agregó a la solución.

Solución 1a. 100 mM de fosfato sódico monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 13.8 g NaH_2PO_4 a 1 L de agua bidestilada (H_2O bidestilada).

Solución 1b. 100 mM de fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4) 14.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1 L de H_2O bidestilada.

Solución de Trabajo DPBS/PVP

Diluir 100 mM PO_4 , pH 7.4 con 800 mL dd H_2O , añadir 9 g de NaCl y 1.0 g de polivinilpirrolidona (PVP), y completar el volumen a 1000 mL con agua bidestilada (dd H_2O). Revisar y verificar el pH a 7.4.

4% Paraformaldehído Fijador - Agregar 500 mL 8% (M/V) de paraformaldehído a 500 mL PBS/PVP (Dilución 1:1)

Solución Madre de BODIPY 493/503

Agregar 10 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) a 10 mg de polvo BODIPY (Invitrogen BODIPY™ 493/503 (Cat no. D3922)), disuelva y haga alícuotas de 200 μL /tubo, almacene a -20°C y proteger de la luz.

Solución de Trabajo de BODIPY 493/503

Añadir 1 μL de solución madre de BODIPY 493/503 a 999 μL de DPBS-PVP.

Hoescht 33342

Preparar la solución madre 1 disolviendo 25 mg de Hoechst 33342 (Sigma B2261) en 2.5 mL de agua bidestilada (10 mg/mL). Almacenar en la oscuridad a 4°C . En el día de uso, prepare la solución madre 2 diluyendo 5 μL de la solución madre 1 en 10 mL de PBS-PVP para producir un 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solución. La solución de trabajo se prepara diluyendo 200 μL de solución madre 2 con 800 μL de PBS-PVP (concentración final 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Etanol

100% Etanol.

Día -1***Recolección de Ovarios***

Los ovarios fueron colectados de hembras bovinas faenadas en el establecimiento de Florida Beef Inc, ubicada a 115 km de las instalaciones del laboratorio. Se utilizó solución salina fisiológica (SSF 0.9% NaCl) previamente temperada a 23 °C y suplementada con 0.5 g/L y 100,000 UI/L de estreptomicina y penicilina. Para el transporte de los ovarios al laboratorio se usó un refrigerador aislado con conexión eléctrica al vehículo para mantener constante la temperatura (23 °C) de los ovarios y evitar choques térmicos.

Acondicionamiento de los Ovarios

En este proceso se clasificaron los ovarios por su calidad, se clasificaron en tres categorías: buenos (>20 folículos pequeños y medianos, no hay presencia abundante de folículos grandes, no hay descoloración), marginales (<10 folículos) y malos (<5 folículos, folículos extremadamente grandes, císticos y cuerpos lúteos (CL) prominentes). Una vez se culminó la clasificación de los ovarios, se realizaron tres lavados con SSF 0.9% NaCl atemperada a 35 °C realizando movimientos de masaje fuerte para retirar la mayor cantidad de sangre en el interior de los ovarios. Los ovarios clasificados en las últimas dos categorías de calidad fueron descartados.

Todos los medios que se utilizaron en las etapas del proceso de producción de embriones *in vitro* (PIV) fueron preparados, atemperados y equilibrados en las incubadoras un mínimo de tres horas antes de iniciar las maniobras.

Recolección de los Ovocitos

Se procedió a la ejecución de la técnica de corte o slashing (técnica de extracción de ovocitos mediante incisiones con bisturí de 2 a 3 mm en ovarios con folículos pequeños y medianos entre 2 y 8 mm), se realizó una limpieza de tejidos en el ovario, retirando acumulaciones de grasa y tejido oviductal. Con la ayuda de pinzas tipo fórceps se sujetó el ovario y posterior a la ejecución de la técnica de slashing se procedió a presionar de manera firme el ovario contra las paredes del recipiente tipo

beaker previamente llenado con medio de colección de ovocitos Boviplus® con el cual se realizaron alrededor de tres lavados por cada ovario para asegurar la extracción de la mayor cantidad de ovocitos posibles, se puede extraer alrededor de 20 ovocitos por ovario, en ocasiones alcanzando rangos entre 30 y 35 ovocitos por ovario (Hansen, 2023). El medio de colección de ovocitos Boviplus® está constituido por sales, bicarbonato, HEPES (Agente Amortiguador de Acido Sulfónico Zwitteriónico), ácido láctico y BSA (Albumina de Suero Bovino). Se desconocen las cantidades por confidencialidad del fabricante.

Por fines de rendimientos en el proceso de FIV, para el presente estudio se utilizaron en promedio 13 ovarios buenos por cada repetición. Posterior a la ejecución de la técnica de slashing se atemperó el medio con los ovocitos extraídos mientras se preparaba el material para la etapa de filtrado.

Se utilizó un filtro celular de 100 µm para separar los ovocitos del medio de colección. Se limpió el filtro sobre una placa Grid de búsqueda atemperada y se limpió el filtro con ayuda de una jeringa, empleando el mismo medio de colección.

A continuación, se realizó la búsqueda y clasificación de ovocitos en estereoscopio a 4x. Los ovocitos de grado 1 y 2 (grado 1: poseen tres a cuatro capas de células del *cumulus oophorus*; grado 2: poseen dos a tres capas de células del *cumulus oophorus* zona pelúcida integra y citoplasma homogéneo y oscuro) fueron lavados al menos tres veces en medio HEPES-TALP (Cuadro 2) con el objetivo de eliminar fluido folicular, restos histológicos y otros *detritus*.

Cuadro 2*Composición del medio de lavado HEPES-TALP.*

Ingredientes	Cantidad
HEPES-TP Solución Base	500 mL
BSA, Fracción V	1.5 g
Gentamicina	375 µL
Na-piruvato	5 mL
pH	7.3 - 7.4
Osmolaridad	255 - 270
Tiempo de Almacenamiento (Meses)	3
Temperatura (°C)	4

Nota. BSA, fracción V: albumina de suero bovino fracción cinco; se realiza filtrado con Nalgene™ Rapid Flow™ con membrana de polietersulfona (PES) de 0.2 µm, medición de pH y osmolaridad; HEPES- TALP solución base (Anexo A).

Se colocaron 10 ovocitos/gota en gotas de 50 µL para una relación final de un ovocito/5 µL de medio de maduración. Se utilizaron platos Petri de 60 × 15 mm cada uno con 19 gotas. Las gotas fueron cubiertas con 7.5 mL de aceite mineral con el objetivo de evitar la deshidratación de los medios, ya que el proceso de incubación con máxima humedad relativa, las microgotas por presentar una alta relación superficie/volumen, tienden a deshidratarse durante la incubación (Jirón y Mendoza, 2022), además le brinda soporte y sostenibilidad a las microgotas. Las placas de maduración fueron preparadas con un mínimo de tres horas antes de la maniobra y puestas a equilibrar en la incubadora. Los ovocitos se maduraron *in vitro* durante 21-23 horas a 38.5 °C y 5% CO₂ y saturación de humedad en un medio de maduración de ovocitos propio del laboratorio de embriones bovinos de UF (Hansen, 2022) (**Error! Reference source not found.**)

Cuadro 3

Composición del medio de maduración (OMM).

Ingredientes	Cantidad
TCM 199	86.926 mL
FBS	10 mL
PEN/STREP	1 mL
Na-piruvato	1 mL
Glutamax	1 mL
pH	7.3 – 7.4
Osmolaridad	260 - 270
Tiempo de Almacenamiento (Meses)	1
Temperatura (°C)	4

Nota. TCM 199: medio suplementado de cultivo de tejidos 199; FBS: suero fetal bovino; PEN/STREP: penicilina y estreptomina; se realiza filtrado con Nalgene™ Rapid Flow™ con membrana de polietersulfona (PES) de 0.2 µm, medición de pH y osmolaridad.

Día 0***Fertilización in vitro (FIV)***

Posterior al tiempo de maduración (21-23 horas se cuentan a partir de la colocación del plato de maduración en la incubadora), se procedió a realizar el proceso de fecundación de los ovocitos. Se verificaron las características de los ovocitos madurados (expansión de las células del *cumulus oophorus*, homogeneidad y presencia/ausencia de patógenos). Una vez se verificaron estos aspectos, se procedió a lavar tres veces los ovocitos maduros en el medio HEPES-TALP descrito, posteriormente, los ovocitos fueron trasladados en un plato Petri 35 mm previamente cargado con 1700 µL de medio de fecundación IVF-TALP (Cuadro 4) y equilibrado tres horas antes en la incubadora 38.5 °C y 5% CO₂ y saturación de humedad.

Cuadro 4

Composición del medio de fertilización IVF-TALP.

Ingredientes	Cantidad
IVF-TP Solución Base	100 mL
EFAF BSA	0.6 g
Gentamicina	50 µL
Na-piruvato	1000 µL
Heparina	1000 µL
pH	7.3 – 7.4
Osmolaridad	280 – 300
Tiempo de Almacenamiento (Meses)	1
Temperatura (°C)	4

Nota. EFAF BSA: albumina de suero bovino libre de ácidos grasos para embriones; se realiza filtrado con Nalgene™ Rapid Flow™ con

membrana de polietersulfona (PES) de 0.2 µm, medición de pH y osmolaridad; IVF-TALP solución base (Anexo B)

Acondicionamiento del Semen por Centrifugación en Gradientes PureSperm® 40% - 80%

El objetivo principal del acondicionamiento del semen es eliminar diluyentes, células muertas y plasma seminal (Jirón y Mendoza, 2022). Los ovocitos maduros fueron fecundados con el semen de un grupo de tres toros diferentes (disminuye la probabilidad de ovocitos no fecundados por mala calidad de semen). El proceso de capacitado se hizo utilizando la técnica de gradientes de concentración 40%-80% (PureSperm®) colocando por soto-posición el gradiente 80% (1.5 mL) en la parte inferior del tubo y en la parte superior el gradiente 40% (1.5 mL) de tal manera que se formen dos fases; este tubo se equilibró dos horas antes de la maniobra en la incubadora.

Descongelación del Semen

El semen congelado en pajuela se descongeló en baño maría a 35 °C, durante 45 segundos. Después de secar las pajuelas, el semen fue depositado en la parte superior del tubo con los gradientes de concentración y centrifugado a 1000 g durante 10 minutos, tiempo al cual fue retirado el pellet del fondo y colocado en la solución de lavado (medio HEPES-TALP, 10 mL) previamente atemperada, para ser nuevamente centrifugado a 200 g durante cinco minutos. Luego se extrajo el pellet del fondo del tubo de lavado, se midió su volumen, para continuamente, ajustar el volumen complementario de medio de fertilización al volumen del pellet para obtener un volumen final de 600 µL.

Se calculó la concentración espermática/mL utilizando la cámara de Neubauer. Una vez se obtuvo la concentración espermática se procedió a aplicar la Ecuación 1 para determinar el volumen de medio de fertilización (IVF-TALP) requerido para alcanzar una concentración espermática final de 1.1×10^6 /mL. Finalmente, se realizó la maniobra de fertilización agregando 120 μ L del espermatozoides acondicionado y 80 μ L de PHE (penicilamina + hipotaurina + epinefrina) para contribuir en el proceso de capacitación del espermatozoides. Se verificó la existencia de motilidad en el espermatozoides y se agitó levemente para realizar el proceso de mezcla de los espermatozoides con los ovocitos maduros.

Posterior a esta maniobra, las placas de fertilización fueron colocadas durante 14-16 horas en la incubadora a 38.5 °C y 5% CO₂ y saturación de humedad.

$$IVF - TALP (VOLUMEN) = (17.647 \times \#ESPERMAS) - 600 \quad [1]$$

Día 1

Cultivo in vitro

Eliminación de las Células del *cumulus oophorus*.

Después de la fertilización, los presuntos cigotos se denudaron utilizando hialuronidasa atemperada + 300 μ L de medio HEPES-TALP para degradar las células del *cumulus oophorus* y pasaron por el vortex durante cinco minutos para asegurar la completa remoción de las células del *cumulus oophorus*.

Posteriormente, se depositó el contenido en una placa Petri X con medio HEPES-TALP en los cuatro pozos, teniendo en cuenta que se deben realizar múltiples lavados de las paredes del tubo eppendorf donde fueron denudados los cigotos presuntivos (observar el tubo bajo el estereoscopio para detectar la presencia de cigotos adheridos a las paredes).

Después de obtener los cigotos putativos denudados se realizaron tres lavados con medio HEPES-TALP y se clasificaron los cigotos presuntivos según la condición en la expulsión del segundo cuerpo polar, clivaje y uniformidad citoplasmática. Aquellos que presentaron claridad en el citoplasma, signos de apoptosis o puntos irregulares en el citoplasma fueron descartados.

Los embriones se dividieron aleatoriamente en dos grupos para ser cultivados durante 7 días en SOF-BE2 (Cuadro 5) + Cloruro de colina 1.8 mM (colina) o SOF-BE2 + cloruro de sodio 1.8 mM (control). Las placas de cultivo fueron preparadas mínimo tres horas antes de la maniobra y puestas a equilibrar en la incubadora a 38.5 °C, 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ y saturación de humedad relativa. El medio de cultivo se cubrió con aceite mineral.

Se prepararon placas únicas para cada tratamiento en los tres tiempos de colección (seis placas en total), con el objetivo de evitar contaminación entre medios en el momento de la colecta, reducir la degeneración de los embriones hasta el momento de la colecta y evitar la apertura de las incubadoras innecesariamente. Se colocaron tres gotas de 50 µL por placa y se realizó la distribución de los embriones uniformemente entre ellas. Se designó una gota por tratamiento para medir los índices de rendimiento del PIV (% Clivaje y % Blastocistos), estos embriones no fueron colectados.

Cuadro 5

Composición del medio de cultivo SOF-BE2.

Ingredientes	Cantidad
SOF-BE2 Solución Base	50 mL
EFAF BSA	0.2 g
GLUTAMAX	250 µL
Na-piruvato	1000 µL
Myo-inositol	500 µL
Citrato de Sodio	500 µL
AA No-Esenciales	500 µL
AA Esenciales	1000 µL
Gentamicina	125 µL
pH	7.3 – 7.4
Osmolaridad	260 – 270
Tiempo de Almacenamiento (Meses)	1
Temperatura (°C)	4

Nota. AA: Aminoácidos; se realiza filtrado con Nalgene™ Rapid Flow™ con membrana de polietersulfona (PES) de 0.2 µm, medición de pH y osmolaridad; SOF-BE2 solución base (Anexo C)

Preparación de los Tratamientos

Para las preparaciones de los tratamientos, una alícuota congelada de un tratamiento control (cloruro de sodio 1.8 mM) o colina (Cloruro de colina 1.8 mM) se diluyó 1:100 en DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Salina tamponada con fosfato de Dulbecco). A continuación, se diluyó 1:10

añadiendo 5 μL de control o tratamiento con colina a una gota de 45 μL de medio de cultivo SOF-BE2 a tres gotas flotantes con un volumen final de 50 μL por gota. El máximo de cigotos que fueron colocados por gota fue de 30 para tener una relación final de 1.66 μL de medio por cada cigoto presuntivo en la máxima capacidad de la gota. La concentración final en la gota será de 1.8 mM adicionales de cloruro de sodio para el control y 1.8 mM de Cloruro de colina para el tratamiento de la colina. La concentración de colina fue asignada con base a los resultados de (Estrada et al., 2020).

Colección y Fijado de Embriones

Los embriones se colectaron a las 38 (>4 células), 51 (>8 células) y 63 horas (>10 células) de iniciado el periodo de cultivo de ambos grupos de tratamiento y se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4%. Para el proceso de fijación, se seleccionaron los embriones que tuvieran características integrales de calidad (homogeneidad en el tamaño de las células y citoplasma oscuro) y que cumplieran con el número de células ideal estimado en el objetivo del estudio.

Posteriormente, se lavaron tres veces en gotas de 100 μL de DPBS y se trasladaron a una gota de paraformaldehído al 4% (PFA) durante 15 minutos, pasado este tiempo, se repitió el proceso de lavado y se almacenó los embriones fijados en placas de 96 cavidades previamente rotuladas, sumergidos en 100 μL de DPBS a 4 °C sin exposición a la luz. Se repitió este proceso para los tres tiempos de colección, por ende, embriones en las tres etapas de desarrollo.

De manera paralela, se sumergieron cinco a seis embriones, con condición equivalente a los anteriores, en etanol 70% durante 30 minutos, con el fin de degradar los lípidos en el interior del embrión. Posteriormente se replicó el proceso de fijación anteriormente descrito. El propósito de estos embriones fue tener un control de la tinción de lípidos con BODIPY 493/503.

Inmunotinción

Para el proceso de inmunotinción se siguió el protocolo descrito por Yue Laboratory. Se lavaron los embriones previamente fijados en cinco gotas de DPBS. Se realizó una dilución de 1:1000 de la solución stock de BODIPY 493/503 y Hoechst 33342 y se agregaron en pozos independientes por

tratamiento y etapa embrionaria para cada uno de los dos tintes dentro del plato de 96 cavidades de manera que no se mezclen los embriones en ningún momento. Se trasladaron los embriones dentro de 200 μ L de la solución funcional de BODIPY 493/503 durante una hora. Posteriormente, se realizó otro proceso de lavado y se sumergieron los embriones en 100 μ L de la solución funcional de Hoechst 33342 durante 30 minutos. Finalmente, se sometió a los embriones por un último proceso de lavado.

Montaje de Placas

El montaje se realizó usando portaobjetos para microscopio. Se colocaron dos muestras por cada portaobjeto (tratamientos / tiempo de colección). Se usaron 7 μ L del anticuerpo para montaje ProLong® Gold y se trasladaron cuidadosamente los embriones dentro de la microgota. Se cubrieron los embriones con un cubreobjetos sin ejercer demasiada presión para evitar la explosión de los embriones, se utiliza vaselina en las esquinas para evitar este suceso.

Tratamientos

Los tratamientos se clasificaron de acuerdo con la concentración de cloruro de colina en el medio de cultivo de los cigotos presuntivos. T1 = 1.8 mM cloruro de colina y T2 = 0 mM cloruro de colina. Al T2 se le adicionó 1.8 mM de NaCl para igualar las condiciones osmolares ya que el cloruro de colina es una sal que afecta este parámetro en el medio (Cuadro 6).

Cuadro 6

Concentración de la suplementación con Cloruro de colina en el medio de cultivo in vitro SOF-BE2 de embriones.

Tratamiento	Concentración de colina
1	1.8mM
2	0mM

Mediciones y Análisis

Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal de marca Zeiss® configurado para operar en los canales Med Sectioning GFP Quad (exposición 60 ms, intensidad de excitación 20%) y

Med Sectioning DAPI Quad (exposición 60 ms, intensidad de excitación 50%) siguiendo el protocolo descrito por (Hoorn, 2021). La excitación en un rango de 400-500 nm y emisión 515 nm. Se tomaron fotografías 3D utilizando un compendio de fotografías secuenciales de un micrómetro entre cada captura. Las imágenes fueron exportadas del software ANDOR IQ3 para posteriormente ser analizadas con el software ImageJ. Se produjo una imagen de capas Z (se unen todas las capturas en una sola imagen de traslape). La imagen generada se analizó con la ayuda de la herramienta de medición de Max Intensidad de fluorescencia presente en un área que previamente delimitada durante el proceso de análisis.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza por cuadrados mínimos utilizando un modelo lineal generalizado (GLM) con medidas repetidas en el tiempo, además, se realizó una prueba de rango múltiple tipo Duncan. Se usó la prueba de normalidad de Kolmogoróv para ajustar los datos utilizando dos desviaciones estándar como patrón. El modelo es descrito por los tratamientos, las repeticiones y el tiempo, teniendo en cuenta las interacciones entre estos tres. El análisis estadístico se realizó utilizando SAS® 9.4. con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$

Variables Analizadas

Se analizaron las siguientes variables:

Máxima intensidad de fluorescencia

Área embrionaria

Media (relación entre la máxima intensidad de fluorescencia y el área embrionaria)

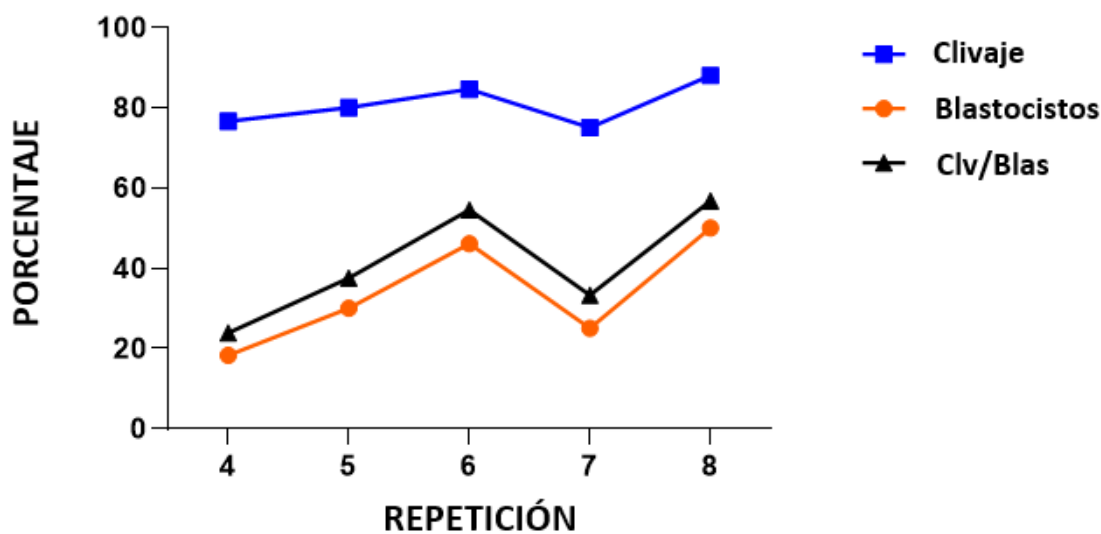
Resultados y Discusión

Rendimiento del PIV

Los ovocitos fueron colectados de ovarios de vacas faenadas utilizando la técnica de “slashing” previamente descrita. Se procesaron 11.6 ovarios y se maduraron 327.2 ovocitos en promedio entre repeticiones. Se cultivaron 261.8 embriones en promedio entre repeticiones, obteniendo un rendimiento de 80% entre ovocitos viables y embriones cultivados, con un descarte del 20% (Cuadro 7). Bajo las condiciones de este estudio, se obtuvo una media de 28.2 ovocitos viables y 22.56 embriones cultivados por ovario (Figura 1).

Figura 1

Tendencia de los indicadores de calidad y eficiencia del proceso de PIV por cada repetición



Los índices principales que se utilizan para la medición de la calidad y eficiencia en el PIV son el clivaje de blastómeros al tercer día post-fertilización y el porcentaje de blastocistos obtenidos a los siete días y medio post-fertilización. En el presente estudio se obtuvo un promedio de clivaje entre repeticiones de 80.84% y 33.89% para el ratio de blastocistos. Según Amorocho (2017), dentro de los indicadores más relevantes para medir calidad dentro de un laboratorio de FIV está la evaluación de

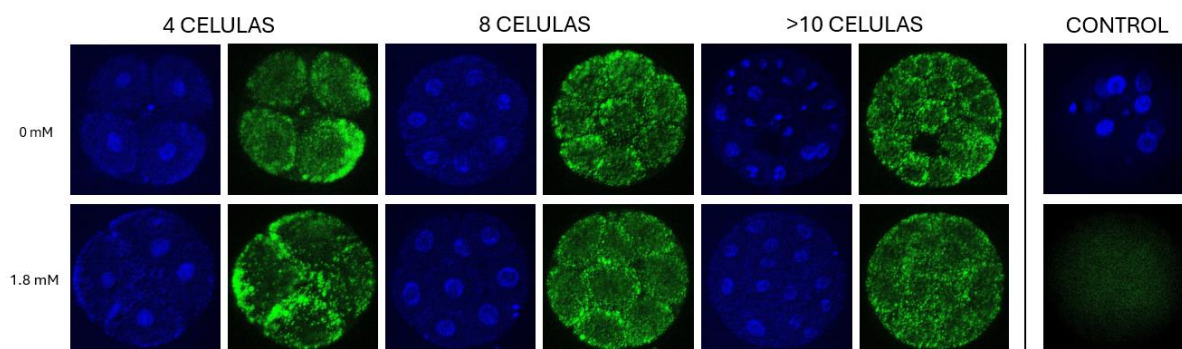
ovocitos viables, el porcentaje de ovocitos fertilizados, la observación de clivaje en el día 2 y 3, y porcentaje de blastocistos después de 7.5 días de fertilización.

Los embriones fueron distribuidos para los dos tratamientos y los tres tiempos de colección de forma aleatoria. El total de embriones entre los dos tratamientos y los tres tiempos de colección que fueron colectados y sometidos al proceso de inmunotinción fue 373. La diferencia marcada entre el total de embriones cultivados y el total de embriones inmunoteñidos (Cuadro 8) está condicionada la calidad de los embriones, partiendo del principio que el índice de la proporción de blastocistos refleja la porción de los embriones que presentaron características deseables y buen desarrollo durante la etapa de cultivo. La presencia de zona pelúcida compacta, uniformidad en el tamaño de los blastómeros y homogeneidad en el color de estos, son algunas de las características ideales para la colección de embriones para el proceso de inmunotinción y análisis. Por esto, solo 373 embriones fueron sometidos a la tinción de los 1309 que fueron cultivados.

Dentro del grupo de los embriones sometidos a inmunotinción, se recolectaron embriones que estaban en el rango entre 3-21 células. Se filtró exclusivamente para los embriones que presentaban el número de células de interés en esta investigación, por lo que, posterior al proceso de filtrado, se obtuvo un total de 164 embriones. La distribución final de embriones analizados se puede observar en el Cuadro 8. En la Figura 2 se puede observar el resultado de la tinción de los embriones en los dos tratamientos, donde se distingue el contenido de células dentro del embrión y la acumulación de gotas lipídicas.

Figura 2

Imágenes representativas de gotas lipídicas citoplasmáticas teñidas con BODIPY 493/503 en embriones de 4, 8 y >10 células cultivados en tratamiento control o en medio suplementado con 1.8 mM de colina

**Cuadro 7**

Índices de interés recolectados durante el proceso de PIV por cada repetición.

Repetición	Ovarios	Oocitos Madurados	Embriones Cultivados	Clivaje (%)	Blastocistos (%)
1	13	370	287	76.6	18.3
2	13	375	256	80	30
3	11	305	278	84.6	46.15
4	10	286	240	75	25
5	11	300	248	88	50
Total	58	1636	1309	-	-
Promedio	11.6	327.2	261.8	80.84	33.89
Rendimiento %		80.0			

Cuadro 8

Número de embriones inmunoteñidos vs número embriones analizados.

Unidad experimental	Control (T1)	Colina (T2)
Embriones analizados		
4 células (38 horas)	22	37
8 células (51 horas)	18	35
>10 células (63 horas)	26	26
Total de embriones analizados		164
Embriones inmunoteñidos (3-21 células)		373

Máxima intensidad de fluorescencia

El indicador de máxima intensidad de fluorescencia hace referencia al valor más alto detectado por el software de análisis en una imagen determinada, en general, la máxima intensidad de fluorescencia se mide en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA). Se busca medir la máxima intensidad de fluorescencia ya que es el valor más significativo con relación a la acumulación de lípidos dentro del embrión. Para determinar la cantidad de lípidos dentro del embrión, individualmente, la intensidad de fluorescencia no es un indicador representativo porque no refleja la relación existente entre la máxima intensidad de fluorescencia y el área embrionaria, el tamaño del embrión determina la cantidad de lípidos que van a estar presentes por unidad de área, lo que diluye la contundencia de concluir exclusivamente con base en el parámetro de la máxima intensidad de fluorescencia, por ende, esta relación resulta determinante para el análisis de los resultados.

No hubo diferencia ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 9) y tampoco existió diferencia ($P > 0.05$) entre ninguna de las fases de desarrollo embrionaria con respecto a los tratamientos. Los embriones con cuatro células en el tratamiento control tuvieron en promedio 185.92 UA de máxima intensidad de fluorescencia y los del tratamiento con adición de colina presentaron una media de 194.7 UA. Para los embriones con ocho células, el tratamiento control presentó un promedio de 210.31 UA en comparación con los embriones tratados con colina que presentaron un promedio de 163.52 UA, aun sin ningún nivel de significancia. Por último, los embriones con más de 10 células en el tratamiento control presentaron un promedio de 217.02 UA en comparación con los embriones tratados con colina que presentaron un promedio de 211.85 UA (Cuadro 10).

Cuadro 9

Media de la máxima intensidad de fluorescencia general utilizando colina en medio de cultivo in vitro.

Tratamiento	0 mM Control	1.8 mM colina
Media (UA)	204.41	189.85
CV		37.7
Probabilidad		0.32

Nota. CV: coeficiente de variabilidad. $P \leq 0.05$ difieren estadísticamente

Cuadro 10

Media de la máxima intensidad de fluorescencia (UA) por tiempo de colección (horas) y número de células utilizando colina en medio de cultivo in vitro.

Tratamiento	Número de células	Tiempo de colección (horas)	Máxima intensidad de fluorescencia (UA)	EE ±	P
Control colina	4	38	185.92 194.57	13.98 18.18	0.7067
Control colina	8	51	210.31 163.12	14.15 25.60	0.1091
Control colina	>10	63	217.02 211.85	17.25 16.19	0.8272

Nota. $P \leq 0.05$ difieren estadísticamente; EE: error estándar

Área Embrionaria

El área embrionaria está determinada por diversos factores involucrados en el desarrollo embrionario. En general, resulta complicado enumerar los parámetros específicos que se correlacionan con el área embrionaria en una determinada etapa de desarrollo. El control del tamaño embrionario es fundamental para el desarrollo y la homeostasis. Los mecanismos que controlan el tamaño del embrión y cómo estos mecanismos afectan el futuro de la célula son todavía desconocidos (Chan et al., 2019). El área embrionaria en este estudio se determinó a partir de la herramienta de trazado libre de ImageJ y se hizo a partir de la generación de una imagen compuesta de diferentes capas (Z stacks) que fueron producto de la captura con el microscopio. Por ende, el área embrionaria que se analizó fue medida en la región ecuatorial del embrión, es decir, el punto donde se presenta el máximo radio del embrión.

Hubo diferencias entre tratamientos ($P \leq 0.05$), los embriones tratados con colina presentaron un área embrionaria promedio de $265611.64 \mu\text{m}^2$ en comparación con los embriones del tratamiento control que tuvieron un área promedio de $251930.03 \mu\text{m}^2$ (Cuadro 11). Hubo diferencias ($P \leq 0.05$) en los embriones de ocho células, los embriones suplementados con colina tuvieron un incremento del 16% en área embrionaria en comparación con los embriones de 8 células del tratamiento control (Cuadro 12).

El área embrionaria, individualmente, no resulta útil para determinar la acumulación de lípidos dentro del embrión. Aun así, la diferencia significativa en el área embrionaria entre los dos tratamientos resulta interesante y abre una incógnita sobre los posibles efectos de suplementar colina en medios de cultivo sobre el área y desarrollo embrionario. Como se mencionó anteriormente, los mecanismos que controlan el tamaño del embrión son desconocidos aún.

Teniendo en cuenta lo anterior, no se puede concluir con certeza que la suplementación con colina este generando cambios en el tamaño del embrión haciéndolo más grande de forma significativa en tres fases de desarrollo, sin embargo, Haimon et al. (2024) comprobaron que la exposición a 1.8 mM de colina en medio de cultivo durante los primeros siete días de desarrollo, altera las características posparto de los terneros. Los terneros de ambos sexos presentaron mayores pesos de nacimiento, mayor peso de canal y mayor eficiencia alimenticia en hembras producto de embriones tratados con colina. Además, Estrada et al. (2021) demostraron que la provisión de colina a embriones preimplantados altera la programación de desarrollo en características como tiempo de gestación, peso de nacimiento y ganancia de peso, en adición, causa cambios en la metilación de ADN en los músculos posparto, incluyendo genes asociados con procesos anabólicos y crecimiento celular.

Cuadro 11

Media del área embrionaria general utilizando colina en el medio de cultivo in vitro.

Tratamiento	0 mM Control	1.8 mM colina
Media (μm^2)	251930.03	265611.64
CV		13.62
Probabilidad		0.0406

Nota. CV: coeficiente de variabilidad. $P \leq 0.05$ difieren estadísticamente

Cuadro 12

*Media del área embrionaria (μm^2) por tiempo de colección y número de células utilizando colina en medio de cultivo *in vitro*.*

Tratamiento	Número de células	Tiempo de colección (horas)	Área embrionaria (μm^2)	EE \pm	P
Control colina	4	38	234987 244671	6303.39 8194.40	0.3506
Control colina	8	51	240727 279591	6380.95 11537.09	0.0038
Control colina	>10	63	280075 272572	7774.99 7296.70	0.4828

Nota. $P \leq 0.05$ difieren estadísticamente; EE: error estándar

Media de Fluorescencia

La media de fluorescencia hace referencia a la máxima intensidad de fluorescencia entre el área embrionaria. Comúnmente se utiliza este indicador como el índice más preciso cuando se mide la acumulación de lípidos dentro de células. La media de fluorescencia basada en el área tiene en cuenta el espacio existente dentro del embrión para la distribución de las gotas lipídicas, por ende, se consigue un resultado que se acerca más al contenido real de lípidos dentro del embrión. La media de fluorescencia es el indicador determinante para concluir los efectos de la suplementación con colina en medio de cultivo *in vitro*.

No existió diferencia entre los tratamientos ($P > 0.05$) como se observa en el Cuadro 13. Aun así, cuando se realizó el análisis comparativo de cada tratamiento según el tiempo de colección y el número de células dentro del embrión, se observa que existe diferencia ($P \leq 0.05$) en los embriones de ocho células (Cuadro 14). Los embriones colectados a las 51 horas (ocho células) que fueron tratados con colina, presentan una reducción en el contenido de lípidos del 26% con respecto a los embriones del tratamiento control (Figura 3). Además, se observa que en los embriones de >10 células que fueron suplementados con colina, existe un aumento no significativo estadísticamente en el contenido lipídico de los embriones suplementados con colina en comparación con los embriones del tratamiento control. Teniendo en cuenta lo anterior, aun sin que se observe un nivel de significancia,

resulta relevante el aumento del contenido de lípidos en los embriones suplementados con colina entre fases de desarrollo que solo difieren en 12 horas entre sí.

Cuadro 13

Media (Max intensidad de fluorescencia / área embrionaria) general utilizando colina en el medio de cultivo in vitro.

Tratamiento	0 mM Control	1.8 mM colina
Media (UA/ μm^2)	45.27	42.71
CV		27.30
Probabilidad		0.2802

Nota. CV: coeficiente de variabilidad. $P \leq 0.05$ difieren estadísticamente

Cuadro 14

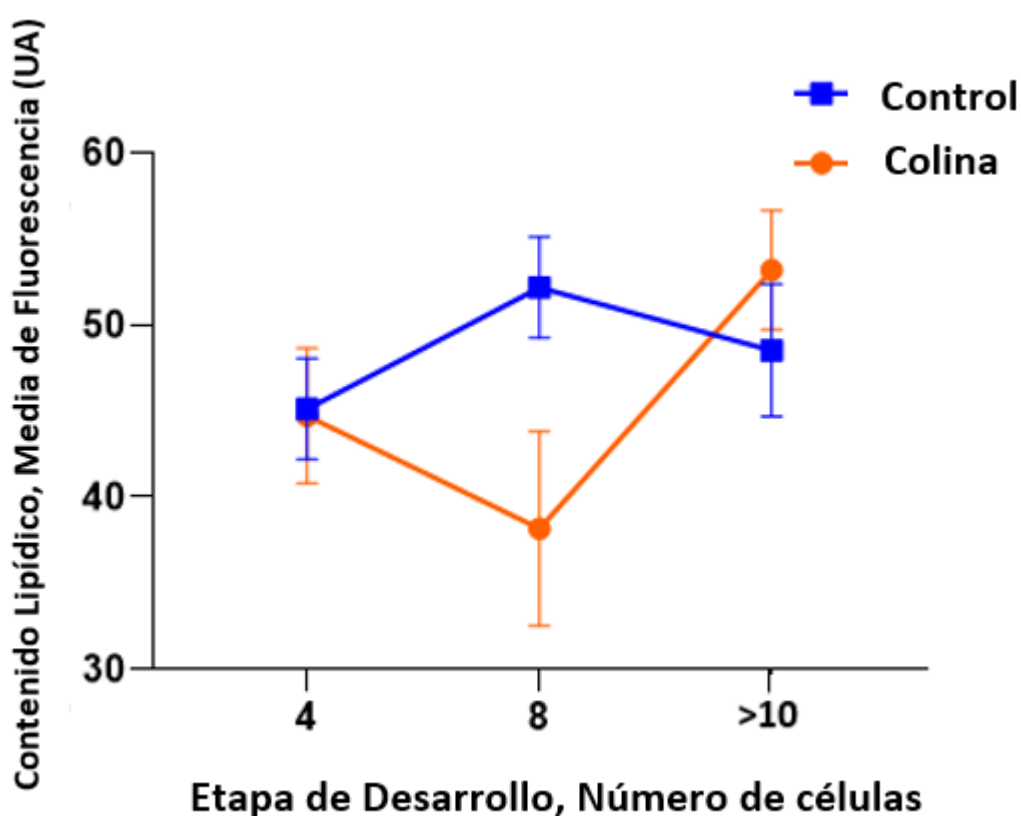
Promedio de la media de fluorescencia por tiempo de colección y número de células utilizando colina en medio de cultivo in vitro.

Tratamiento	Número de células	Tiempo de colección (horas)	Media de fluorescencia (UA/ μm^2)	EE \pm	P
Control colina	4	38	41.70	2.2483	0.6761
			43.24	2.9228	
Control colina	8	51	49.09	2.2760	0.0074
			36.31	4.1151	
Control colina	>10	63	45.04	2.7732	0.3518
			48.59	2.6026	

Nota. $P \leq 0.05$ difieren estadísticamente; EE: error estándar

Figura 3

Contenido de lípidos de acuerdo con la media de fluorescencia según la etapa de desarrollo embrionaria (número de células) en embriones del tratamiento control y suplementados con colina en medio de cultivo *in vitro*.



Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se cree que la disminución de la acumulación de lípidos en los embriones de ocho células suplementados con colina es causada por la activación del genoma embrionario (AGE). El proceso de AGE es momento de inicio de la primera transcripción después de la fertilización, es un evento importante donde el nuevo genoma embrionario conduce la diferenciación de todos los tipos de células en estado adulto. Después de la fertilización, el genoma del cigoto está transcripcionalmente inactivo y se da en una etapa y tiempo específico según la especie. En bovinos, el proceso de AGE se da en embriones que se encuentran entre ocho y 16 células.

El genoma del embrión es gradualmente activado en un tiempo que se denomina transición genómica maternal – cigoto (TMC), donde se transfiere el control del desarrollo embrionario desde los reguladores maternos a los controladores cigóticos, entre ellos genes que regulan la acumulación y transporte de lípidos dentro del embrión (Haimon et al., 2024; Perera et al., 2023).

Con base en lo anterior, y teniendo en cuenta que la colina es un componente estructural en la formación de fosfatidilcolina, uno de los fosfolípidos más abundantes dentro del embrión, la colina kinasa que está encargada de la formación de fosfocolina, interviene para incrementar la síntesis de fosfatidilcolina y puede ser acetilada para convertirse en una proteína kinasa activa que ayuda en los procesos de lipólisis de gotas lipídicas, y además, la colina participa en la ruta metabólica para formación de Betaina, un compuesto donador de metilos en la metilación del ADN mediante la vía de oxidación de colina. Se cree que la disponibilidad de colina en el momento de la AGE acelera los procesos mediados por genes de regulación lipídica que recién fueron transcritos y además contribuye a la metilación de los genes reguladores. Según Andrade y Poehland (2021) el perfil lipídico en embriones que están en la etapa del primer clivaje tiene considerables similitudes con el del ovocito que lo produjo, pero, en la etapa de ocho a 16 células, cuando ocurre la activación del genoma embrionario, el perfil lipídico del embrión es altamente alterado, lo que está correlacionado con la activación de mecanismos de regulación metabólica de lípidos para preparar al embrión para la transición a mórula y posteriormente a blastocisto.

En general hay muchos genes relacionados con el control y regulación de lípidos en el embrión en etapas tempranas de desarrollo. ACSL3, ELOVL5 Y ELOVL6 son los principales genes asociados al metabolismo de lípidos, encargados de la activación de cadenas largas de ácidos grasos para generar cadenas largas de acil – CoA, elongación de ácidos grasos para producción de cadenas largas de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente.

En un estudio realizado por Sudano et al. (2016) donde se analizaron los signos involucrados en el desarrollo del lipidoma en embriones tempranos, descubrió que existían biomarcadores

independientes del medio de cultivo que podían ser asociados a una etapa de desarrollo específica del embrión. Para la etapa de 8-16 (AGE), hubo una fluctuación en el contenido de gotas lipídicas correlacionadas con una sobre transcripción de los genes asociados que fueron mencionados anteriormente, además, hubo más presencia de algunos lípidos (fosfatidilcolina protonada [32:0], [34:2], [36:5] y fosfatidilcolina sodada [32:0]) donde la colina es un componente estructural principal. Lo que permite considerar, que la colina está teniendo un papel de regulación génica sobre los genes ACSL3, ELOVL5 Y ELOVL6, además, se cree que una parte de la colina suplementada está siendo inmediatamente metabolizada para la producción de los lípidos anteriormente sugeridos.

Finalmente, se puede corroborar la tendencia de los resultados con un indicador que relaciona la media de fluorescencia con el mismo valor de área total que lo compone. Este índice, permite comprender que la distribución del contenido de lípidos es constante y uniforme. Los resultados relacionados con el indicador media / área se pueden observar en los Cuadros 15 y 16).

Cuadro 15

Media / Área general utilizando colina en el medio de cultivo in vitro.

Tratamiento	0 mM Control	1.8 mM colina
Media (UA/Área ²)	0.00018777	0.00016694
CV		29.63
Probabilidad		0.0491

Nota. CV: coeficiente de variabilidad. P ≤ 0.05 difieren estadísticamente

Cuadro 16

Media / Área por tiempo de colección y número de células utilizando colina en medio de cultivo in vitro.

Tratamiento	Número de células	Tiempo de colección (horas)	Media de fluorescencia (UA/Área ²)	EE ±	P
Control colina	4	38	0.00018267 0.00017796	0.00000999 0.00001298	0.7744
Control colina	8	51	0.00020928 0.00013462	0.00001011 0.00001828	0.0005
Control colina	>10	63	0.00017136 0.00018825	0.00001232 0.00001156	0.3193

Nota. P ≤ 0.05 difieren estadísticamente; EE: error estándar

Conclusiones

En este estudio, la suplementación con colina en el medio de cultivo *in vitro* tiene efectos en la acumulación de gotas lipídicas en embriones de ocho células colectados 51 horas después de la fertilización.

La adición de colina en medios de cultivo *in vitro* no tiene efectos representativos en el contenido lipídico de embriones con cuatro y >10 células.

La suplementación con colina en medio de cultivo *in vitro* produce cambios en el área embrionaria y acumulación de lípidos internos y estos pueden estar asociados a los sistemas de regulación genética en genes ligados al metabolismo de lípidos en etapas tempranas.

Recomendaciones

Evaluar el efecto de la suplementación con colina en medio de cultivo *in vitro* en mórulas y blastocistos.

Evaluar el efecto de la suplementación con colina en medio de cultivo *in vitro* utilizando técnicas como MALDI-MS (Matrix Assited Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry) o espectrometría de masas para obtener resultados más precisos.

Realizar estudios evaluando el nivel de transcripción de genes asociados a la regulación de lípidos dentro del embrión, en embriones de ocho células suplementados con colina en medio de cultivo *in vitro* y embriones sin ninguna suplementación.

Realizar estudios comparativos entre diferentes suplementos asociados al metabolismo de lípidos y las diferencias entre los efectos de estos.

Referencias

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T. y Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*, 57–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11774376/>
- Amorocho, B. (2017). Control de calidad en un laboratorio de FIV. *Rev Asoc Est Biol Rep*, 22(1), 28–35. <https://revista.asebir.com/control-de-calidad-en-un-laboratorio-de-fiv/>
- Andrade, M.-S. y Poehland, R. (2021). Lipid Metabolism in Bovine Oocytes and Early Embryos under In Vivo, In Vitro, and Stress Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073421>
- Annes, K., Sudano, M. J [Mateus José], Belaz, K. R. A [Katia Roberta A.], Tata, A., Santos, V. G [Vanessa Gonçalves], Da Fonseca Junior, A. M., Dos Santos, É. C., Eberlin, M. N [Marcos Nogueira] y Milazzotto, M. P. (2019). Lipid characterization of in vitro-produced bovine embryos with distinct kinetics of development. *Zygote (Cambridge, England)*, 27(6), 413–422. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000534>
- Arshad, U., Husnain, A., Poindexter, M. B., Zimpel, R., Nelson, C. D. y Santos, J. E. P. (2023). Rumen-protected choline reduces hepatic lipidosis by increasing hepatic triacylglycerol-rich lipoprotein secretion in dairy cows. *J Dairy Sci*, 106(11), 7630–7650. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23182>
- Bradley, J., Pope, L., Masia, F., Sanusi, R., Langbein, W., Swann, K. y Borri, P. (2016). Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy. *Development (Cambridge, England)*, 143(12), 2238–2247. <https://doi.org/10.1242/dev.129908>
- Caudill, M. A. (2010). Pre- and postnatal health: Evidence of increased choline needs. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(8), 1198–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.05.009>
- Chan, C. J., Costanzo, M., Ruiz-Herrero, T., Mönke, G., Petrie, R. J., Bergert, M., Diz-Muñoz, A., Mahadevan, L. y Hiiragi, T. (2019). Hydraulic control of mammalian embryo size and cell fate. *Nature*, 571(7763), 112–116. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1309-x>
- Chi, F., Sharpley, M. S., Nagaraj, R., Roy, S. S. y Banerjee, U. (2020). Glycolysis-Independent Glucose Metabolism Distinguishes TE from ICM Fate during Mammalian Embryogenesis. *Developmental Cell*, 53(1), 9-26.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.02.015>
- Estrada, E., Negrón-Peréz, V. M., Tríbulo, P [P.], Zenobi, M. G., Staples, C. R [C. R.] y Hansen, P. J. (2020). Effects of choline on the phenotype of the cultured bovine preimplantation embryo. *J Dairy Sci*, 103(11), 10784–10796. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18598>
- Estrada, E., Ortiz, W. G., Chebel, R. C [Ricardo C.], Jannaman, E. A., Moss, J. I., Castro, F. C. de, Zolini, A. M [Adriana M.], Staples, C. R [Charles R.] y Hansen, P. J [Peter J.] (2019). Embryo and cow factors affecting pregnancy per embryo transfer for multiple-service, lactating Holstein recipients. *Transl Anim Sci*, 3(1), 60–65. <https://doi.org/10.1093/tas/txz009>

- Estrada, E., Ortiz, W., Rabaglino, M. B., Block, J [Jeremy], Rae, O., Jannaman, E. A., Xiao, Y. y Hansen, P. J [Peter J.] (2021). Choline acts during preimplantation development of the bovine embryo to program postnatal growth and alter muscle DNA methylation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(10), e21926. <https://doi.org/10.1096/fj.202100991R>
- Ferraz, P. A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J. E. P., Chebel, R. C [R. C.] y Galvão, K. N. (2016). Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology*, 86(7), 1834–1841. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.032>
- Freedman, R., Hunter, S. K., Law, A. J., Clark, A. M., Roberts, A. y Hoffman, M. C. (2022). Choline, folic acid, Vitamin D, and fetal brain development in the psychosis spectrum. *Schizophrenia Research*, 247, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2021.03.008>
- Ghanem, N., Ha, A.-N., Fakruzzaman, M., Bang, J.-I., Lee, S.-C. y Kong, I.-K. (2014). Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology*, 82(2), 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.024>
- Glier, M. B., Green, T. J. y Devlin, A. M. (2014). Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(1), 172–182. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200636>
- Haimon, M. L. J., Estrada-Cortés, E., Amaral, T. F., Martin, H., Jeensuk, S., Block, J [J.], Heredia, D., Venturini, M., Santos Rojas, C., Gonella-Díaz, A., DiLorenzo, N., Scheffler, T., Dufour, P., Sirard, M.-A., Melo, G. D. de, Pohler, K. G. y Hansen, P. J. (2024). Provision of choline chloride to the bovine preimplantation embryo alters postnatal body size and DNA methylation. *Biology of Reproduction*. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioae092>
- Hansen, P. (2022). *In Vitro Production of Bovine Embryos*. <https://animal.ifas.ufl.edu/hansen/lab-protocols/>
- Hoorn, Q. (2021). *Confocal Microscope Protocol*. Dept. of Animal Sciences, University of Florida. <https://animal.ifas.ufl.edu/hansen/lab-protocols/>
- Ibayashi, M., Aizawa, R., Mitsui, J. y Tsukamoto, S. (2021). Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction (Cambridge, England)*, 162(6), R99-R109. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0238>
- Janati, S., Le Bourhis, D., Lefevre, A., Emond, P., Le Berre, L., Desnoës, O., Joly, T., Buff, S., Freret, S., Schibler, L., Salvetti, P. y Elis, S. (2022). Effects of the donor factors and freezing protocols on the bovine embryonic lipid profile†. *Biology of Reproduction*, 106(3), 597–612. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab198>
- Jirón, J. y Mendoza, B. (2022). *Producción in vitro de embriones bovinos utilizando Insulina Transferrina-Selenio (ITS) en el medio de maduración* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/697f1641-ca57-4169-95b2-9cf43444221e/content>

- Lima, C. B. de, Ferreira, C. R [Christina Ramires], Milazzotto, M. P., Sobreira, T. J. P., Vireque, A. A. y Cooks, R. G. (2018). Comprehensive lipid profiling of early-stage oocytes and embryos by MRM profiling. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 53(12), 1247–1252. <https://doi.org/10.1002/jms.4301>
- Lipinska, P., Pawlak, P. y Warzych, E. (2023). Species and embryo genome origin affect lipid droplets in preimplantation embryos. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1187832. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1187832>
- Milazzotto, M. P., Lima, C. B. de, Da Fonseca, A. M., Dos Santos, E. C. y Ispada, J. (2020). Erasing gametes to write blastocysts: Metabolism as the new player in epigenetic reprogramming. *Animal Reproduction*, 17(3), e20200015. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0015>
- Milazzotto, M. P., Noonan, M. J. y Almeida Monteiro Melo Ferraz, M. de (2022). Mining RNAseq data reveals dynamic metaboloepigenetic profiles in human, mouse and bovine pre-implantation embryos. *IScience*, 25(3), 103904. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103904>
- Perera, C., Idrees, M., Khan, A. M., Haider, Z., Ullah, S., Kang, J.-S., Lee, S.-H., Kang, S.-M. y Kong, I.-K. (2023). Pdgfr β Activation Induced the Bovine Embryonic Genome Activation via Enhanced NFYA Nuclear Localization. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/ijms242317047>
- Potts, S. B., Brady, K. M., Scholte, C. M., Moyes, K. M., Sunny, N. E. y Erdman, R. A. (2023). Rumen-protected choline and methionine during the periparturient period affect choline metabolites, amino acids, and hepatic expression of genes associated with one-carbon and lipid metabolism. *J Dairy Sci*, 106(7), 4559–4579. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22334>
- Santos, J. E., Cerri, R. L. y Sartori, R. (2008). Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, 69, 88–97. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17959235/>
- Sudano, M. J [Mateus J.], Rascado, T. D. S., Tata, A., Belaz, K. R. A [Katia R. A.], Santos, V. G [Vanessa G.], Valente, R. S., Mesquita, F. S., Ferreira, C. R [Christina R.], Araújo, J. P., Eberlin, M. N [Marcos N.] y Landim-Alvarenga, F. D. C. (2016). Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology*, 86(2), 472-484.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.025>
- Tribulo, P [Paula], Balzano-Nogueira, L., Conesa, A., Siqueira, L. G. y Hansen, P. J [Peter J.] (2019). Changes in the uterine metabolome of the cow during the first 7 days after estrus. *Molecular Reproduction and Development*, 86(1), 75–87. <https://doi.org/10.1002/mrd.23082>
- Uffo, O. (2011). Producción animal y biotecnologías pecuarias: nuevos retos. *Revista Salud Animal*, 33(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s0253-570x2011000100002&script=sci_arttext&tlng=pt
- Zolini, A. M [Adriana Moreira], Carrascal-Triana, E., Ruiz de King, A., Hansen, P. J [Peter J.], Alves Torres, C. A. y Block, J [Jeremy] (2019). Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 133, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.005>

Anexos

Anexo A

Ingredientes y cantidades requeridos para la preparación de la solución base del medio de lavado

HEPES – TALP.

HEPES - TL Solución Base en agua FIV							
Componente	Sigma Cat #	Peso Mol	mM	g/L	g/2L	g/4L	g/6L
NaCl	S5886	58.5	114	6.669	13.338	26.676	40.014
KCl	P5405	74.6	3.2	0.2384	0.4768	0.9536	1.4304
NaHCO ₃	S5761	84.01	2	0.168	0.336	0.672	1.008
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	S9638	137.99	0.4	0.048	0.096	0.192	0.288
Na DL-Lactate	L7900	112.06	10	1416μL	2832μL	5664μL	8496μL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	C7902	147.01	2	0.2938	0.5876	1.1752	1.7628
MgCl ₂ · 6H ₂ O	M2393	203.3	0.5	0.1017	0.2034	0.4068	0.6102
HEPES	H4034	238.4	10	2.384	4.768	9.536	14.304
OSMOLARIDAD	255 - 270						
pH	7.3 - 7.4						

El tiempo de almacenamiento máximo es de 6 meses almacenada a una temperatura de 4 °C

Anexo B

Ingredientes y cantidades requeridos para la preparación de la solución base del medio de fertilización IVF - TALP.

FIV - TL Solución Base en agua FIV					
Componente	Sigma Cat #	Peso Mol	mM	mg/L	g/2L
NaCl	S5886	58.5	114	6669	6.669
KCl	P5405	74.6	3.2	238.72	0.23872
NaHCO ₃	S5761	84.01	25	2100.25	2.10025
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	S9638	137.99	0.4	55.196	0.055196
Na DL-Lactate	L7900	112.06	10	1.416	1416µL
CaCl ₂ · 2H ₂ O	C7902	147.01	2	222.2	0.2222
MgCl ₂ · 6H ₂ O	M2393	203.3	0.5	101.65	203.3
OSMOLARIDAD	280 - 300				
pH	7.3 - 7.4				

El tiempo de almacenamiento máximo es de 6 meses almacenada a una temperatura de 4 °C

Anexo C

Ingredientes y cantidades requeridos para la preparación de la solución base del medio de cultivo

SOF-BE2.

SOF-BE2 Solución Base en agua FIV					
Componente	Sigma Cat #	Peso Mol	mM	mg/L	g/2L
CaCl ₂ . 2H ₂ O	C7902	147.01	1.17	172.00	0.172
MgCl ₂ . 6H ₂ O	M2393	203.3	0.49	99.62	0.0996
KH ₂ PO ₄	P5655	136.09	1.19	161.95	0.1619
KCl	P5405	74.6	7.16	533.80	0.5338
NaCl	S5886	58.5	107.7	6294.00	6.2940
NaHCO ₃	S5761	84.01	25.07	2106.13	2.1061
Na DL-Lactate	L7900	112.06	5.3	775.5μL	775.5μL
OSMOLARIDAD	280 - 300				
pH	7.3 - 7.4				

El tiempo de almacenamiento máximo es de 6 meses almacenada a una temperatura de 4 °C