

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación
**Efecto de dos concentraciones de O₂ en la producción *in vitro* de embriones
bovinos**

Estudiantes

Daniela Sarahi Murillo Pinto

Juan Moisés Matute López

Asesores

John Jairo Hincapié, D.Sc.

Isidro A. Matamoros, Ph.D.

Honduras, agosto 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ROGEL CASTILLO

Director Departamento Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	6
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	13
Localización	13
Obtención de los Ovarios.....	13
Aspiración de los Ovocitos (Día -1)	14
Maduración in vitro (MIV)	15
Fertilización <i>in Vitro</i> (FIV) (día 0).....	16
Preparación del Gradiente de Percoll 45-90%.....	18
Descongelación del Semen	19
Cultivo <i>in Vitro</i> (día 1)	19
Desempaque/Denudación (Eliminar las Células del <i>Cumulus oophorus</i>)	20
Variables analizadas.....	21
Diseño Experimental y Analisis Estadístico.....	21
Resultados y Discusión.....	22
Recolección de Ovocitos	22
Porcentaje de Maduración (MIV)	23
Porcentaje de Fertilización <i>in Vitro</i> (FIV)	25
Porcentaje de Clivaje y Apoptosis.....	27
Porcentaje de Embriones, Mórulas y Blastocitos	29
Eficiencia General	31

Conclusiones 33

Recomendaciones 34

Referencias..... 35

Anexos..... 38

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Medio de Colección de Ovocitos (MCO).	14
Cuadro 2 <i>Medio de Maduración de Ovocitos (MMO)</i>	15
Cuadro 3 Medio de capacitación y acondicionamiento.	16
Cuadro 4 Preparación del medio 10X SP-TL para Percoll 90%.	16
Cuadro 5 Preparación del Percoll 90%.	17
Cuadro 6 Preparación del Percoll 45%.	17
Cuadro 7 Preparación del medio de fertilización in vitro (FIV).	18
Cuadro 8 Preparación del medio de cultivo SOF (Fluido Sintético de Oviducto).	19
Cuadro 9 Valores porcentuales de ovocitos madurados y fertilizados in vitro para los tratamientos con 20% o 5% de oxígeno en las atmósferas de maduración y fertilización.	26
Cuadro 10 Valores porcentuales de ovocitos en clivaje y apoptosis al tercer día para los tratamientos con 5% o 20% de oxígeno en la atmósfera de cultivo	28
Cuadro 11 Valores porcentuales de embriones y su categoría para los tratamientos con 5% o 20% de oxígeno en la atmósfera de cultivo.	30
Cuadro 12 Eficiencia en la producción in vitro de embriones bovinos, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje utilizando dos concentraciones de oxígeno (5% y 20%).	31

Índice de Figuras

Figura 1 Ovocitos obtenidos de la aspiración folicular. A) ovocitos viables. B) Ovocitos degenerados.	23
Figura 2 A) ovocitos no madurados hora 0; B) ovocitos maduros hora 24 (nótese la expansión de las células del cumulus oophorus).	26
Figura 3 A) Presuntos cigotos sin clasificar a las 18 horas del proceso FIV B) Ovocito fecundado (nótese la presencia del segundo cuerpo polar).....	27
Figura 4 Clivaje a las 72 horas en el tratamiento FIV de 20% O ₂	29
Figura 5 Clivaje a las 72 horas en el tratamiento FIV de 5% O ₂	29
Figura 6 Blastocitos al día 7.....	30

Índice de Anexos

Anexo A Recolección de ovarios.	38
Anexo B Acondicionamiento de ovarios.	39
Anexo C Aspiración Folicular.....	40
Anexo D Búsqueda ovocitos viables.	41
Anexo E Instrumentos utilizados.	42
Anexo F Tratamientos. A) FIV 5% O2 B) FIV 20% O2.....	43
Anexo G Microgotas flotantes para maduración in vitro.	44

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos concentraciones de O₂ (5% O₂ y 20% O₂) en la producción de embriones bovinos *in vitro*. Se aspiraron 196 ovarios obtenidos de vacas faenadas, se obtuvieron 1035 ovocitos aspirados de los cuales 749 fueron viables y se distribuyeron en los dos tratamientos: 360 ovocitos para 5% O₂ y 389 ovocitos para 20% O₂. Se utilizaron los medios de MIV, FIV y CIV de Minitube® en ambos tratamientos. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (20% O₂ y 5% O₂), y el análisis con la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2). Hubo diferencias entre los tratamientos 20% y 5% de O₂ ($P \leq 0.05$) al analizar cada etapa en forma individual con valores para MIV, FIV, Clivaje y embriones de 85.6% y 75.83%; 79.88% y 71.06%; 68.42% y 79.38%; 51.10% y 68.83% respectivamente. Igualmente, hubo diferencias ($P \leq 0.05$) en la eficiencia general para los tratamientos con 5% y 20% de O₂ en las relaciones embriones/ovocitos maduros, embriones/ovocitos fertilizados y embriones/ovocitos en clivaje con valores de 38.83% y 27.93%; 54.64% y 34.96%; 68.83% y 51.10% respectivamente. Se concluye que los mejores porcentajes por etapas de maduración y fertilización *in vitro* se obtuvieron con la concentración de 20% de O₂, sin embargo, la concentración de 5% de O₂, mostró tener al final del procedimiento de PIV la mejor eficiencia al relacionar el porcentaje de embriones producidos con los porcentajes de maduración, fertilización y clivaje.

Palabras clave: Atmósferas de cultivo, blastocistos, mórulas, ovocitos.

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the effect of two concentrations of O₂ (5% O₂ and 20% O₂) in the production of bovine embryos in vitro. 196 ovaries of cows obtained from the slaughterhouse were aspirated, 1035 aspirated oocytes were obtained, of which 749 were viable and were distributed in the two treatments: 360 oocytes for 5% O₂ and 389 oocytes for 20% O₂. Minitube® IVM, IVF and VSD media were used in both treatments. A Completely Random Design (DCA) was used with two treatments (20% O₂ and 5% O₂), and the analysis with the Chi-Square Frequency Distribution test (χ^2). There were differences between the 20% and 5% O₂ treatments ($P \leq 0.05$) when analyzing each stage individually with values for IVM, IVF, Cleavage and embryos of 85.6% and 75.83%; 79.88% and 71.06%; 68.42% and 79.38%; 51.10% and 68.83% respectively. Likewise, there were differences ($P \leq 0.05$) in the general efficiency for the treatments with 5% and 20% of O₂ in the relationships embryos / mature oocytes, embryos / fertilized oocytes and embryos / oocytes in cleavage with values of 38.83% and 27.93%; 54.64% and 34.96%; 68.83% and 51.10% respectively. It is concluded that the best percentages by stages of maturation and in vitro fertilization were obtained with the concentration of 20% of O₂, however, the concentration of 5% of O₂, showed to have the best efficiency at the end of the IVP procedure when relating the percentage of embryos produced with the percentages of maturation, fertilization and cleavage.

Keywords: Atmosphere, blastocyst, embryo, oocyte.

Introducción

En lo que concierne a las biotecnologías aprovechadas en la reproducción bovina, recientemente se registraron avances realmente significativos a nivel internacional, proporcionando la posibilidad de aumentar la adquisición de estas herramientas. La biotecnología de la reproducción comprende al conjunto de técnicas desde inseminación artificial hasta la clonación, que permiten acrecentar la eficiencia reproductiva de los animales bovinos (Palma GA 2001). El uso de biotecnologías en la reproducción permite, acelerar los progresos genéticos sobre la base de los cuatro factores siguientes: aumentar la variación genética, acrecentar la exactitud de la selección, reducir el intervalo entre generaciones e incrementar la intensidad de la selección (Georges 2006).

Asimismo, la producción de embriones *in vitro* (PIV) consiste en la recolección de los ovarios ya sea *post mortem* u ovocitos *in vivo* por medio de laparoscopia o aspiración folicular guiada por ultrasonografía (Gonella Diaza et al. 2013). Inmediatamente, se procede a seleccionar los ovocitos según su evaluación morfológica clasificándolos en cuatro diferentes categorías, que luego serán llevados a un medio que consienta la maduración *in vitro* (MIV) y posteriormente la fertilización *in vitro* (FIV) hasta lograr el pertinente cultivo embrionario (CIV) como tal (Dias Gonçalves et al. 2007).

La maduración de los ovocitos *in vivo* es un fenómeno complejo en la cual se sufre cambios bioquímicos y metabólicos desde el estadio de profase I hasta el de ovocitos maduros para la fecundación, el ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de LH, o bien, cuando es retirado del folículo para llevar a cabo la maduración *in vitro* (Palma G 2001; Peláez Peláez 2011). Es de naturaleza, que a partir de la presencia de un cuerpo fetal se forme una cantidad finita de folículos por la cual durante el crecimiento folicular, antes del nacimiento ocurre un arresto meiótico en la que sin ningún estímulo de LH no podrá completar la división meiótica, en contrario, se puede reiniciar hasta alcanzar la pubertad o en condiciones *in vitro* de forma espontánea, luego que el ovocito abandona el folículo y requiere un tiempo promedio de 24 horas para evidenciar la presencia del primer cuerpo polar (Arlotto et al. 1996).

Las condiciones de maduración son determinantes en la eficiencia del proceso y se centran en el medio de maduración de ovocitos, el cual constituye el sustrato que debe otorgar al ovocito las fuentes energéticas, proteicas, minerales, antibióticas y hormonales para su maduración. Las condiciones físico químicas, deben ofrecer al ovocito los componentes necesarios para imitar al ambiente folicular y el oviducto, entre estos, la temperatura, el pH, la presión osmótica y la composición atmosférica (Sagirkaya et al. 2007; Neil Vásquez et al. 2009). Dicho esto, dentro de las condiciones de cultivo, la concentración de oxígeno juega un papel importante en la calidad embrionaria, teniendo secuelas directas en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Neil Vásquez et al. 2009), las cuales tienen un efecto perjudicial en diferentes biomoléculas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, afectando el desarrollo embrionario y la tasa de preñez (Corrêa et al. 2008).

Debido a que los procesos de producción *in vitro* de embriones bovinos son llevados a cabo en ambientes de mayores concentraciones de O_2 (20%) en relación al ambiente *in vivo* (3-5%) el aumento en la concentración de O_2 es directamente proporcional en los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Vásquez et al. 2014). Algunos estudios sugieren que la disminución de la concentración de O_2 a un 5% en las condiciones *in vitro* favorece el desarrollo embrionario (Arias et al. 2012). Sin embargo, también se indica que la concentración atmosférica de oxígeno (5% y 20%) durante la MIV, no genera efectos deletéreos sobre la maduración nuclear del ovocito. Asimismo, se han obtenido resultados que el nivel de O_2 no afecta la proporción de embriones unicelulares sometidos al clivaje (Khurana y Niehmann 2000). Se alude que durante el desarrollo embrionario estos dependen de la fosforilación oxidativa y del consumo de O_2 , misma que cesa al iniciarse la compactación, lo cual indica que el desarrollo puede estar influenciado por los cambios en la concentración de O_2 (Mantilla Cabrera 2012).

Con base en lo anterior se realizó el presente trabajo de investigación el cual tuvo como objetivo general determinar el efecto de dos concentraciones de oxígeno (O_2) en la producción de

embriones bovinos *in vitro*; tomando en cuenta, los siguientes objetivos específicos: Determinar los porcentajes *in vitro* de maduración, fertilización y clivaje; Determinar el porcentaje de embriones (mórulas y blastocitos) obtenidos a los ocho días de cultivo *in vitro* y Determinar la eficiencia de cada una de las etapas del proceso de fertilización *in vitro* bajo dos concentraciones de oxígeno.

Materiales y Métodos

Localización

La investigación se desarrolló entre el periodo de agosto de 2020 a abril de 2021 en el laboratorio de Reproducción Animal, en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada a 32 kilómetros de Tegucigalpa, en una zona con una altura de 800 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 24 °C y 1100 mm de precipitación anual.

Obtención de los Ovarios

Los ovarios fueron obtenidos de vacas faenadas de la planta de cárnicos de la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA), situada a cinco kilómetros del laboratorio de Reproducción Animal. Aproximadamente 48 horas antes de realizar la maniobra se dejaron encendidas las incubadoras de O₂ y CO₂ con el fin de permitir que se equilibraran correctamente y comprobar su estado normal de funcionamiento. Asimismo, cuatro horas antes de salir hacia la planta de sacrificio, se dejó atemperando a 38 °C todo el material necesario.

Dos horas antes de obtener los ovarios, se preparó la solución de transporte, para la cual se utilizó Solución Salina Fisiológica al 0.9% (SSF) suplementada con antibióticos (estreptomina 0.5 g/litro + penicilina G 100,000 UI/litro) atemperado a 35 °C. A medida que se colectaron los ovarios, se fueron depositando en la solución de transporte, tiempo que no superó las cuatro horas entre la recolección y su procesamiento en el laboratorio.

En el laboratorio, los ovarios se sometieron al proceso de acondicionamiento, el cual consistió en retirar todos los restos de tejidos como grasa, trompas y cuernos uterinos. Una vez acondicionados se lavaron en tres ocasiones en SSF (0.9%) atemperada en baño maría a 35 °C para retirar los restos de sangre.

Aspiración de los Ovocitos (Día -1)

Se utilizaron las soluciones madre de Minitube® durante todo el procedimiento de PIV. A continuación, para la aspiración de los ovocitos se utilizaron agujas de calibre 18 × 1 ½ pulgadas y jeringas de dos piezas estériles. A medida que se fueron aspirando los folículos, el líquido folicular se fue depositando en un tubo de 50 mL de policarbonato estéril que contenía 5 mL de Medio de Colección de Ovocitos (MCO) (Cuadro 1) atemperado a 38 °C en baño maría. Únicamente se aspiraron los folículos con diámetro entre 2-10 mm aproximadamente, una vez terminada la maniobra de aspiración, se dejó sedimentar por 10 minutos para decantar los ovocitos.

Cuadro 1

Medio de Colección de Ovocitos (MCO).

Ingrediente	Cantidad
Solución madre Minitube MCO 19990/0050® MCO	10 mL
Suero Albúmina Bovino EFAF	60 mg

Nota. Atemperar a 38 °C cuatro horas antes de realizar la maniobra. EFAF: Essential Fatty Acids Free (libre de ácidos grasos esenciales).

Simultáneamente se prepararon dos placas de maduración (Petri de 35 mm) con micro-gotas flotantes de 100 µl de Medio de Maduración de Ovocitos (MMO) (Cuadro 2) equilibradas en las incubadoras según el tratamiento uno a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) y el tratamiento dos a 38 °C, 5% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%), colocando ocho micro-gotas por placa Petri, cubriendo con aceite mineral y equilibrando cuatro horas antes de realizar la aspiración de ovocitos, en las incubadoras de acuerdo al tratamiento pertinente; asimismo, se rotularon las placas acordes con el tratamiento. Se depositaron 10 ovocitos por gota (proporción de 1 ovocito/10 µl de MMO)

Una vez terminada la maniobra de aspiración se dejó reposar el fluido folicular por 10 minutos para que los complejos de *cumulus* – ovocitos decantaran, procediendo a eliminar el sobrenadante muy suavemente teniendo la precaución de no crear turbulencia en el fondo del tubo a fin de evitar perder ovocitos, dejando solamente 5 mL en el fondo, utilizando en el proceso una pipeta de precisión

de 1000 μ l. Este volumen se vertió en una placa Grid atemperada y el tubo de 50 mL se lavó con (MCO) en cuatro ocasiones a fin de recuperar los ovocitos que pudieron haber quedado adheridos en las paredes del tubo. Luego, se inició la búsqueda y clasificación de los ovocitos en el estereoscopio utilizando aumentos de 2x a 4x; una vez fueron identificados los ovocitos, se aspiraron con la pipeta Drummond y transferidos a una placa Petri X que contiene en los pozos uno, dos y tres 1000 μ l de MCO y en el pozo cuatro 1000 μ l de MMO para iniciar con el lavado de dichos ovocitos.

Cuadro 2

Medio de Maduración de Ovocitos (MMO).

Ingrediente	Cantidad
Solución madre Minitube MMO 19990/0010® MMO	9 mL
Suero de Vaca en Celo	60 mg
FSH madre (50 UI de FSH/10 mL de SSF estéril)	100 μ l
LH madre (25 UI de LH/5 mL de SSF estéril)	50 μ l

Nota. Esterilizar por filtración a 0.22 μ m. Equilibrar: 5 mL para el tratamiento uno a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) y 5 mL para el tratamiento dos a 38 °C, 5% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Maduración in vitro (MIV)

Los ovocitos extraídos fueron clasificados y seleccionados de tal manera que solo se utilizaron los ovocitos categorías 1 y 2 de acuerdo con la clasificación Minitube (s.f.) (más de tres filas de células del *cumulus oophorus*, zona pelúcida íntegra y citoplasma homogéneo y oscuro); a continuación, se describe la clasificación utilizada (Leibfried y First 1979):

Categoría 1: presenta más de cinco capas compactas de célula de *cumulus* que lo rodean en toda su superficie, presentan citoplasma granuloso y homogéneo por lo que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Categoría 2: se presenta rodeado parcialmente por más de tres capas compactas de células de *cumulus*, presentan citoplasma homogéneo (periferia clara y centro oscuro), y lleno completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Categoría 3: presenta inconsistentemente menos de tres capas de células de *cumulus* expandido, presentan citoplasma granuloso no homogéneo y que no llena el espacio delimitado por la zona pelúcida.

Categoría 4: se presenta denudado, presentan citoplasma granuloso irregular no homogéneo y solo está rodeado por la zona pelúcida.

Luego, de que los ovocitos seleccionados fueran lavados tres veces en MCO y una vez en MMO se transfirieron a las micro-gotas de MMO que se encontraban en las incubadoras a una proporción de 10 ovocitos/microgota y se colocaron a madurar durante 24 horas dividiéndolos en 389 ovocitos para el tratamiento uno a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) y 360 ovocitos para el tratamiento dos a 38 °C, 5% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Fertilización *in Vitro* (FIV) (día 0)

Se preparó todo el material cuatro horas antes de iniciar la fertilización *in vitro*. El Cuadro 3 describe la preparación del medio de capacitación y acondicionamiento.

Cuadro 3

Medio de capacitación y acondicionamiento.

Ingrediente	Cantidad
Solución madre Minitube Medio de Capacitación 19990/0020®	20 mL
Suero Albúmina Bovino Fracción V	120 mg
Piruvato de sodio (solución madre) *	1000 µl
Gentamicina	200 µl

Nota. *11 mg de Piruvato de sodio en 5 mL de DPBS (Dulbeccos PBS). Se esterilizó por filtración a 0.22 µm.

Se fraccionó el volumen en dos tubos de policarbonato de 15 mL colocando 10 mL en cada uno (uno por tratamiento) y luego se llevaron a equilibrar durante dos horas en las incubadoras.

Cuadro 4

Preparación del medio 10X SP-TL para Percoll 90

Ingrediente	Cantidad
Agua ultra pura	100 mL
NaCl	4.675 g
KCl	0.23 g
NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O	0.40 g
HEPES	2.38 g

Nota. Ajustar el pH a 7.3, esterilizar por filtración en 0.22 µm. Almacenar a 4 °C.

Cuadro 5

Preparación del Percoll 90%

Ingrediente	Cantidad
Solución 10X SP-TL	8 mL
Bicarbonato de sodio	0.168 g
Lactato de Sodio	180 µl
Agitar suavemente hasta que el bicarbonato se disuelva completamente. Luego agregar:	
Percoll	72 mL
MgCl ₂	316 µl
CaCl ₂	156 µl

Nota. Mezclar suavemente, ajustar pH a 7.3-7.45. Esterilizar por filtración en 0.45 µm. No debe formarse precipitado

Se colocó 3 mL de Percoll 90% en un tubo de 15 mL y se equilibró en la incubadora al tratamiento uno a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) y los otros 3 mL de Percoll 90% se colocó y equilibrio en la incubadora al tratamiento dos a 38 °C, 5% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%), cuatro horas antes de la maniobra de FIV

Cuadro 6

Preparación del Percoll 45%

Ingrediente	Cantidad
Solución medio de capacitación y acondicionamiento	3 mL
Percoll 90%	3 mL

Nota. Equilibrar 3 mL de Percoll 45% para el tratamiento uno y para el tratamiento dos los otros 3 mL de Percoll 45% 4 horas antes de la FIV.

Cuadro 7

Preparación del medio de fertilización in vitro (FIV).

Ingrediente	Cantidad
Solución madre Fertilización Minitube 19990/0030®	10 mL
Suero Albúmina Bovino EFAF	60 mg
Piruvato de sodio	100 µl
Heparina	200 µl

Nota. Se esterilizó por filtración a 0.22 µm. se equilibró en las incubadoras: 5 mL para tratamiento uno a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) y 5 mL para el tratamiento dos a 38 °C, 5% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%), EFAF: Essential Fatty Acids Free (libre de ácidos grasos esenciales)

Se prepararon dos placas nunc de fertilización depositando 600 µl/pozo. No se cubrió con aceite mineral y se colocó a equilibrar en las incubadoras tanto el tratamiento uno como el dos en sus respectivas atmósferas, durante cuatro horas antes de realizar la maniobra de fertilización.

Preparación del Gradiente de Percoll 45-90%

Una hora antes de ejecutar la maniobra de fertilización, para cada tratamiento, se depositaron los 3 mL del Percoll al 90% lentamente por sotoposición en el fondo del tubo que contiene los 3 mL del Percoll 45% de tal manera que se formó un menisco entre los dos gradientes de densidad, quedando en el fondo el Percoll 90% y encima el 45%, después se retornó nuevamente a la incubadora.

Una vez cumplidas las 24 horas de maduración, se transfirieron los ovocitos de cada tratamiento a dos placas Petri X (una para cada tratamiento) las cuales contenían en dos pozos gotas de 1000 µl de medio FIV de cada tratamiento, se realizaron dos lavados y se pasaron a las placas nunc

de FIV correspondiente a cada tratamiento, conservando la proporción de 1 ovocito/10 μ l de medio, y se colocaron nuevamente a la incubadora.

Descongelación del Semen

Se descongelaron en agua a 35 °C por 45 segundos cuatro pajuelas de semen del mismo toro, se secaron y se armó la pistola de inseminación, depositando muy suavemente el semen de dos pajuelas encima del gradiente de Percoll 45% correspondiente a cada tratamiento.

Luego para cada tratamiento se realizó la centrifugación a 1000 g por 10 minutos (utilizando una centrífuga atemperada), luego se retiró el pellet del fondo con una pipeta de 1000 μ l y se depositó en el tubo que contenía el medio de acondicionamiento / capacitación, procediendo nuevamente a centrifugar por 10 minutos a 200 g; al cabo de este tiempo se retiró el sobrenadante dejando solamente 0.5 mL en el fondo del pellet. Se realizó el cálculo de la concentración utilizando la cámara de Neubauer, tomando 95 μ l de agua y 5 μ l del semen (diluido al 5%), se cargó la cámara y se llevó al microscopio a 40x contando cinco cuadros de doble borde. Haciendo un cálculo rápido se tomó 600 μ L que corresponden al volumen de cada pozo de la placa de FIV la cual se dividió por el número de espermatozoides contados. El resultado obtenido corresponde al volumen en μ L que debe tomarse del tubo que contiene los espermatozoides para fertilizar con 1×10^6 /mL de FIV. Se depositó el volumen calculado en cada pozo de la placa de FIV correspondiente a cada tratamiento y se regresó nuevamente las placas de FIV a la incubadora durante 18 horas.

Cultivo *in Vitro* (día 1)

Cuadro 8

Preparación del medio de cultivo SOF (Fluido Sintético de Oviducto).

Ingrediente	Cantidad
Solución madre Medio de Cultivo SOF Minitube 19990/0041®	10 mL
Suero de Vaca en Celo	1 mL
Aminoácidos esenciales	400 µl
Aminoácidos no esenciales	100 µl
Gentamicina	60 µl

Nota. Esterilizar por filtración a 0.22 µm

Dos horas antes de realizar la maniobra se preparó dos placas nunc (una para cada tratamiento) con microgotas flotantes de 100 µl cubiertas con aceite mineral; Después, se equilibró el tratamiento uno a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) y el tratamiento dos a 38 °C, 5% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Desempaque/Denudación (Eliminar las Células del *Cumulus oophorus*)

Terminado el tiempo de fertilización para ambos tratamientos, se colocaron los presuntos ovocitos fertilizados de cada tratamiento en dos tubos Eppendorf de 1.5 mL con 600 µl de H-SOF + 100 µl de Hialuronidasa atemperada en cada uno, se dejó sedimentar durante 5 minutos y se eliminó muy suavemente entre 400 a 500 µl del sobrenadante, se llevó al vórtex durante 3 minutos. Después, se depositó el contenido de cada Eppendorf en una placa Petri X con gotas de 800 µl de H-SOF rotulados de acuerdo con el tratamiento, a medida que se lavaron los ovocitos fertilizados fueron clasificados y seleccionados. Se realizaron tres lavados y se colocaron de 10 ovocitos/gota de cultivo SOF de cada tratamiento y luego se llevó las placas de cultivo debidamente rotuladas nuevamente a la incubadora.

Evaluación de los cultivos:

A las 72 horas del cultivo se suplementó con 10% de Suero Fetal Bovino (10 µl/gota) y se evaluó la tasa de división celular (clivaje)

En el día ocho se evaluó la tasa de producción de mórulas y blastocitos aplicando la fórmula

1:

$$\text{Tasa de Producción de mórulas y blastocisto} = \frac{\# \text{ embriones segmentados}}{\# \text{ embriones colocados inicialmente}} \times 100 \quad (1)$$

Tratamientos

Se desarrollaron dos tratamientos:

FIV 20% O₂: Atmósfera de 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

FIV 5% O₂: Atmósfera de 38 °C, 5% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Variables analizadas

Se analizaron las siguientes variables: Porcentaje de maduración *in vitro*, Porcentaje de fertilización *in vitro*, Porcentaje de clivaje (división celular), Porcentaje de apoptosis (muerte celular)
Porcentaje de embriones obtenidos (mórulas-blastocistos)

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (20% O₂ y 5% O₂) y 389 y 360 ovocitos viables para los tratamientos 20% de O₂ y 5% de O₂ respectivamente. El análisis de los datos se realizó con 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

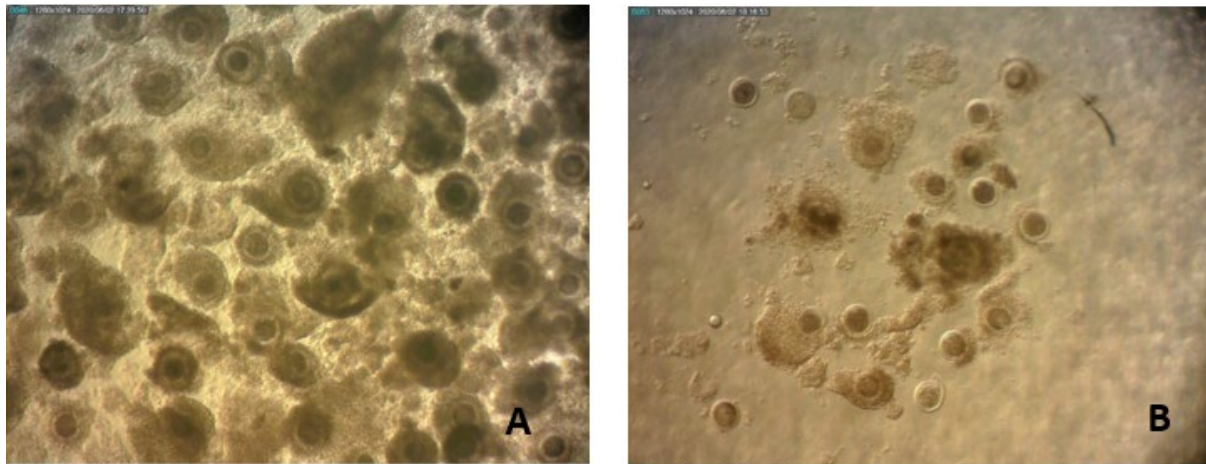
Recolección de Ovocitos

Mediante la técnica de punción de los folículos ováricos se procesaron 196 ovarios de vacas *post mortem*, consiguiendo un total de 1035 ovocitos aspirados, de los cuales se utilizaron 513 ovocitos para el FIV de (20% O₂) obteniendo 389 (75.83%) ovocitos viables dejando 124 (24.17%) ovocitos degenerados y dando un promedio de 3.67 ovocitos viables por ovario; para el tratamiento de (5% O₂) se utilizaron 522 ovocitos, con 360 (68.97%) ovocitos viables, 162 (31.03%) ovocitos degenerados dando un promedio de 4 ovocitos viables (OV) por ovario; la Figura 1 Muestra un grupo de ovocitos viables y uno degenerado durante el proceso de lavado, clasificación y selección.

Marizancén Silva y Artunduaga Pimentel (2017), reportaron que la diferencia en el número de ovocitos viables por ovario se debe a los factores que afectan la fertilidad de la hembra como la condición corporal (CC), estrés calórico y nutrición. Cabe añadir, que la experiencia del operario influye en el número de folículos aspirados, ovocitos recuperados y el desarrollo posterior de embriones (Caicedo 2008).

Figura 1

Ovocitos obtenidos de la aspiración folicular. A) ovocitos viables. B) Ovocitos degenerados.



Porcentaje de Maduración (MIV)

Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 9; Figura 2), siendo el tratamiento de 20% O_2 el que tuvo el mayor porcentaje de maduración superando en 9.77% al tratamiento de 5% O_2 . Se consideraron como ovocitos maduros, aquellos que poseían una capa de *cumulus ophorus* denso y expandido en la superficie con un citoplasma uniforme.

Los resultados con 20% de O_2 son superiores a los reportados por Neil Vásquez et al. (2009), quienes realizaron un estudio comparando dos métodos de incubación sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos y utilizando 20% de oxígeno, obtuvieron 71.52% de MIV, sin embargo, estos mismos autores al utilizar 5% de oxígeno obtuvieron un porcentaje de MIV de 79.18% similar al obtenido en esta investigación; estas diferencias se atribuyen a que en el presente trabajo los ovocitos que se colocaron a madurar fueron mayor cantidad ya que se utilizaron 749 ovocitos en comparación con Neil Vásquez et al. (2009), quienes utilizaron 100 ovocitos (50 para cada tratamiento de 5 y 20% de O_2) para la maduración, lo cual indica que, bajo las condiciones de este estudio, la concentración de O_2 a 20% en la (MIV) favorece el porcentaje de maduración en ovocitos. Además, durante el proceso de MIV se encuentran presentes las células del *cumulus oophorus* en gran cantidad, lo que sugiere una mayor demanda de O_2 por parte de estas, situación que se puede ver comprometida cuando se

trabaja al 5% de O₂. De igual manera, Pinyopummintr y Bavister (1995) concluyen que una disminución en las concentraciones de O₂ durante la MIV, afecta negativamente el porcentaje de ovocitos que alcanzan el estadio de metafase II. De igual manera Banwell et al. (2007), concluyeron que ovocitos madurados a concentraciones bajas de O₂ como 2%, se relacionaba con una afectación severa de la competencia ovocitaria dando como resultado un mayor porcentaje de apoptosis. De acuerdo con Hyttel et al. (1997), la competencia ovocitaria involucra dos eventos celulares: la maduración nuclear y la maduración citoplasmática. Durante la maduración nuclear el ovocito reinicia la meiosis hasta alcanzar el estadio de metafase II y nuevamente se detiene, reiniciando solamente si se sucede la fecundación (Hafez 1989); la maduración citoplasmática se relaciona con la habilidad del ovocito para contribuir en la formación del pronúcleo masculino luego de la penetración del espermatozoide, y así adquirir la capacidad para el desarrollo posterior, es decir para soportar el desarrollo embrionario temprano; estos eventos se suceden mucho antes del periodo preovulatorio.

Lonergan et al. (2001), concluyen que alrededor del 90% de los ovocitos colocados a MIV alcanzan el estadio de metafase II, estando el tratamiento con 20% de O₂ similar a lo recomendado por este autor, sin embargo, el tratamiento con 5% de O₂ se encuentra por debajo del valor establecido.

Por otra parte, (Fischer y Bavister 1999) concluyen de sus investigaciones que el ambiente ovárico posee una concentración de oxígeno inferior a la atmosférica y que esta se acerca al 20%, lo cual puede ser una razón de los resultados obtenidos en la presente investigación. Además de lo anterior, según (Cetica et al. 2001) se han realizado diferentes investigaciones en las cuales se ha determinado que uno de los factores claves en los sistemas de MIV son las concentraciones de O₂, ya que esto implica estudiar los sistemas que favorecen la disminución de las especies reactivas de oxígeno (EROs), las cuales se producen en forma normal como producto del metabolismo celular y que a su vez han sido relacionadas con diversas alteraciones a nivel celular, sin embargo, se ha demostrado que tanto el ovocito como las células del *cumulus oophorus* poseen la capacidad de

expresar enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa, lo que sugiere que el ovocito *per se* posee la capacidad de controlar los EROs, sin embargo, pese a la efectividad de estos sistemas, los medios MIV utilizados en atmósferas de 20% de O₂ siempre son suplementados con antioxidantes como el mercaptoetanol, vitamina E (selenio) y cisteamina entre otros.

Porcentaje de Fertilización *in Vitro* (FIV)

Los ovocitos fertilizados fueron aquellos en los cuales el espermatozoide consiguió penetrar el *cumulus oophorus* del ovocito, llegando a la zona pelúcida y desencadenar la reacción acrosómica, dando como resultado la formación de una célula diploide llamada cigoto y la expulsión del segundo cuerpo polar. Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 9; Figura 3), siendo el tratamiento con 20% de O₂ el que obtuvo los mayores porcentajes, superando en 8.82% al tratamiento con 5% de O₂.

Los resultados de esta investigación con 20% de O₂ son similares a los obtenidos por (Pinyopummintr y Bavister 1995) quienes evaluaron el gas óptimo para la maduración y fertilización *in vitro*, y obtuvieron porcentajes de fertilización de 87% con 20% O₂, sin embargo, estos mismos autores obtuvieron 53.1% de FIV para 5% de O₂, siendo un valor muy inferior al obtenido en esta investigación; estos mismos autores concluyeron que los porcentajes de FIV son considerablemente más altos ($P \leq 0.05$) cuando se utilizan concentraciones de 20% de O₂ en comparación de 5% de O₂ y además el porcentaje de poliespermia aumentaba notablemente cuando la FIV se realizó en O₂ reducido (26.6 % en 5% de O₂ frente a 15.4% en 20% de O₂; $P < 0,05$), lo cual podría ser una de las causas de la diferencias obtenidas en este estudio, de igual manera, Pinyopummintr y Bavister (1995) concluyen que los valores bajos de O₂ (5%) durante las etapas de MIV y FIV causan un detrimento en el desarrollo de los ovocitos, y recomiendan que durante estas dos etapas del proceso se debe utilizar 5% de CO₂ y 20% de O₂. Por otra parte, de acuerdo con (Lonergan et al. 2001) concluyen que un porcentaje aceptable de FIV debe estar alrededor de 80%, estando ambos valores de esta

investigación cercanos a dicho valor establecido. Por lo tanto, los resultados de la presente investigación demuestran que al utilizar la atmósfera con 20% O₂ en el FIV, mejora el porcentaje de fecundación en los ovocitos.

Cuadro 9

Valores porcentuales de ovocitos madurados y fertilizados in vitro para los tratamientos con 20% o 5% de oxígeno en las atmósferas de maduración y fertilización.

Tratamiento	Ovocitos Madurados %	Ovocitos Fertilizados %
20% de oxígeno	85.6	79.88
5% de oxígeno	75.83	71.06
CV	7.8806	6.8998
Probabilidad	0.0007	0.0116

Nota. CV: Coeficiente de variabilidad

Figura 2

A) ovocitos no madurados hora 0; B) ovocitos maduros hora 24 (nótese la expansión de las células del cumulus oophorus).

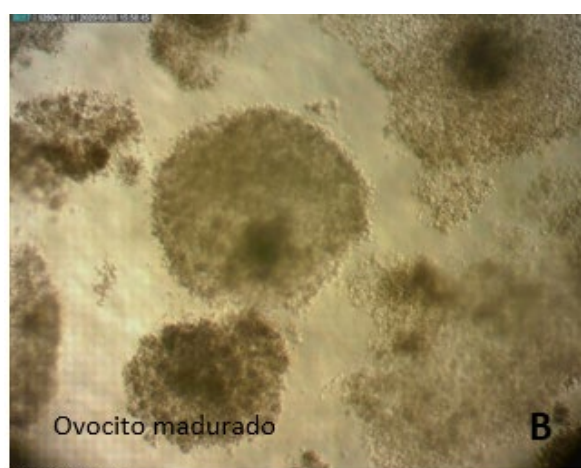
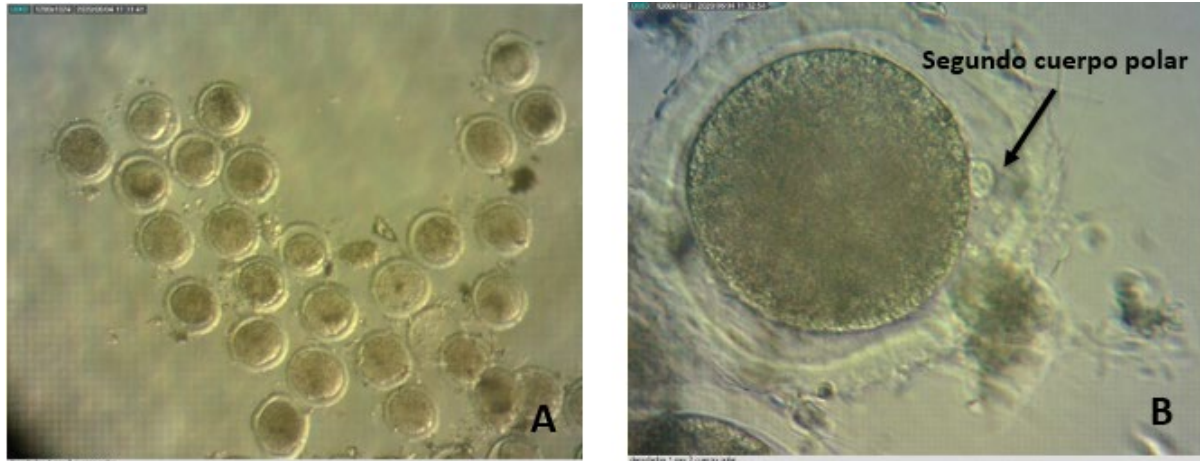


Figura 3

A) Presuntos cigotos sin clasificar a las 18 horas del proceso FIV B) Ovocito fecundado (nótese la presencia del segundo cuerpo polar).



Porcentaje de Clivaje y Apoptosis

El clivaje es la división celular, proceso mitótico que da inicio al desarrollo embrionario, en la que el cigoto se divide y da origen a dos células llamadas blastómeros, que forman la mórula, luego la blástula hasta llegar a la gástrula; la apoptosis es la muerte celular programada (Sánchez 2014). Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 10), siendo el tratamiento con 5% O_2 el que obtuvo el mayor porcentaje de clivaje superando al tratamiento de 20% O_2 en 10.96%, al igual que en el porcentaje de apoptosis el tratamiento con 5% de O_2 fue el que obtuvo el menor porcentaje.

Estos resultados superan los reportados por (Yoneda et al. 2004) quienes evaluaron a las 72 horas el porcentaje de embriones con ocho células, obteniendo porcentajes de clivaje en ovocitos denudados de 37.1% en la atmósfera de 5% O_2 y 34.3% en la de 20% O_2 , una de las posibles razones es porque se utilizaron ovocitos de porcinos. Sin embargo, en la investigación de (Leivas et al. 2006) no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en el porcentaje de clivaje en las atmósferas de 5% y 20% de O_2 , con valores de 69.6 y 40.4%, respectivamente; estos mismos autores concluyeron que la

concentración atmosférica no tuvo influencia en el clivaje de ovocitos y en el desarrollo de embriones debido al hecho de que la FIV no se había evaluado por separado, sino junto con la MIV. Sin embargo, (Thompson et al. 1990) concluyeron que las concentraciones de O₂ que se encontraban entre 4 y 8% producían los mejores porcentajes de clivaje; de igual manera (Fischer y Bavister 1999) concluyeron que las concentraciones de oxígeno intrauterino disminuyen drásticamente a medida que se forma el blastocisto y se da el proceso de implantación con valores de 5.3% y 3.5% de O₂ respectivamente, indicando que el desarrollo *in vivo* de los embriones en los estadios de peri-implantación requiere de bajas concentraciones de O₂. De igual manera (Yuan et al. 2003) en su investigación sobre la influencia de la tensión de oxígeno en la apoptosis y la eclosión en embriones bovinos cultivados *in vitro* concluyeron que la concentración de oxígeno al 5% es óptima para el cultivo *in vitro* de embriones bovinos en medios libres de células (es decir no utilizando co-cultivo), resultados que confirman los obtenidos en este estudio, demostrando que al utilizar una atmósfera de 5% de O₂ mejora el porcentaje de ovocitos en clivaje a las 72 horas pos fertilización *in vitro*, evento que puede estar relacionado con un incremento de la competencia ovocitaria desarrollada en las etapas anteriores.

Cuadro 10

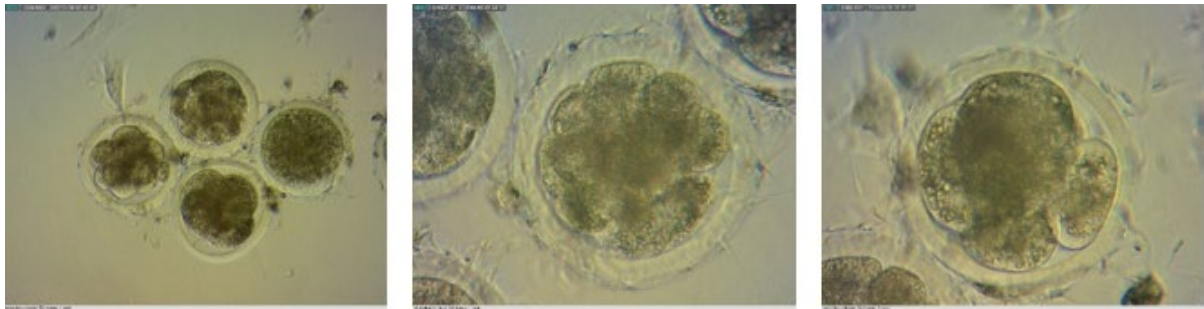
Valores porcentuales de ovocitos en clivaje y apoptosis al tercer día para los tratamientos con 5% o 20% de oxígeno en la atmósfera de cultivo

Tratamiento	Ovocitos Clivaje %	Ovocitos Apoptosis al 3 día (%)
20% de oxígeno	68.42	31.58
5 % de oxígeno	79.38	20.62
CV	8.5529	16.6036
Probabilidad	0.0089	0.0089

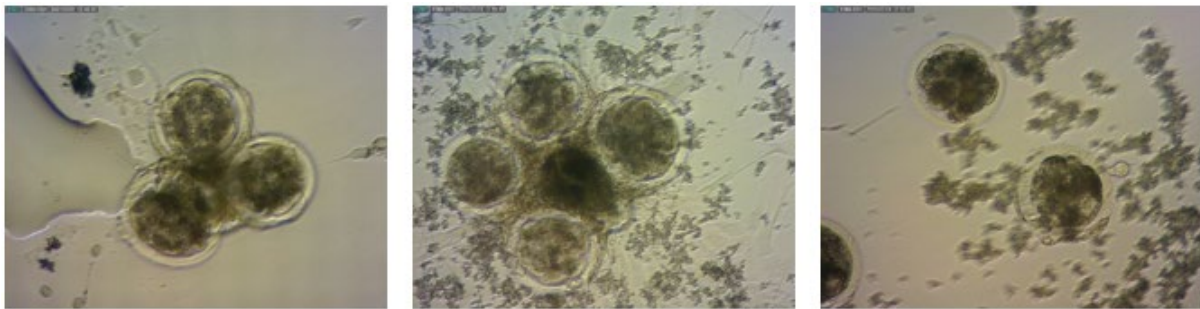
Nota. CV: Coeficiente de variabilidad

Figura 4

Clivaje a las 72 horas en el tratamiento FIV de 20% O₂.

**Figura 5**

Clivaje a las 72 horas en el tratamiento FIV de 5% O₂.



Porcentaje de Embriones, Mórulas y Blastocitos

Las diferencias encontradas fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 11) para los embriones obtenidos, siendo el tratamiento con 5% de O₂ el que obtuvo el mayor porcentaje superando al tratamiento 20% de O₂ en 17.73%. De igual manera el mayor porcentaje de blastocitos se obtuvo con el tratamiento de 5% de O₂, superando al 20% de O₂ en 32.33%; en cuanto a las mórulas el mayor porcentaje lo obtuvo el tratamiento con 20% de O₂ superando al tratamiento con 5% de O₂ en 32.33; este aspecto es muy importante ya que en dependencia del grado de desarrollo y calidad se pueden esperar resultados de preñez con embriones *in vitro* que oscilan entre 54% para blastocistos expandidos y calidad I mientras que con mórulas calidad I los porcentajes pueden variar desde un 26 hasta un 51%, condición que se encuentra relacionada con el grado de desarrollo y el grosor de la zona pelúcida ya que esta facilitará el proceso de protrusión del embrión y su posterior implantación, por

lo tanto, el mejor estadio para realizar la transferencia embrionaria es el de blastocisto expandido (Palma 2001).

Los resultados de esta investigación superan a los de (Leivas et al. 2006) quienes al utilizar una concentración de oxígeno de 5 y 20% obtuvieron porcentajes de blastocitos de 53.44 y 53.12% respectivamente, sugiriendo que al utilizar un 5% de O₂ en la concentración atmosférica durante el clivaje pudo haber estimulado el desarrollo embrionario.

Cuadro 11

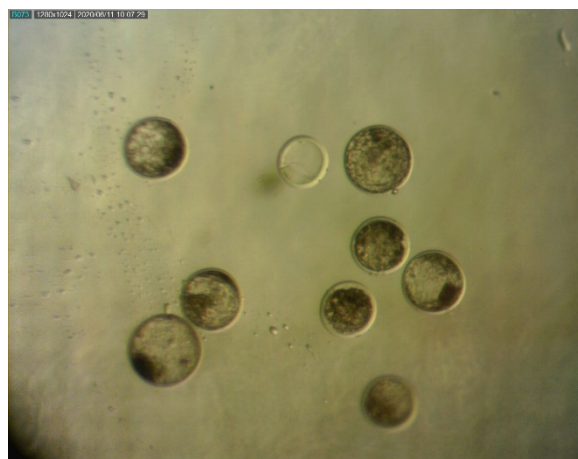
Valores porcentuales de embriones y su categoría para los tratamientos con 5% o 20% de oxígeno en la atmósfera de cultivo.

Tratamiento	Embriones (%)	Mórulas (%)	Blastocitos (%)
20 % de oxígeno	51.1	55.91	44.09
5 % de oxígeno	68.83	23.58	76.42
CV	14.5067	35.3215	26.6735
Probabilidad	0.001	<0.0001	<0.0001

Nota. CV: Coeficiente de variabilidad

Figura 6

Blastocitos al día 7.



Blastocitos expandidos día 8 1 ses



Blastocitos expandidos día 8 1 ses

Eficiencia General

Las diferencias encontradas no fueron significativas ($P > 0.05$) para las relaciones entre el número de embriones producidos de acuerdo con los ovocitos viables, sin embargo, para la relación de embriones producidos por ovocito madurado, fertilizado y en clivaje si hubo diferencias ($P \leq 0.05$), siendo el tratamiento con 5% O₂ el que obtuvo los mayores valores superando al tratamiento con 20% O₂ en 10.9%, 19.68% y 17.73% respectivamente en cada etapa del procedimiento del FIV (Cuadro 12).

(Hashimoto et al. 2000) realizaron un estudio en donde la relación de embriones obtenidos por ovocitos madurados fue de 28% en la atmósfera de 5% O₂ y 16% en la de 20% O₂, resultados que son similares a los de este estudio, indicando que una baja concentración de oxígeno favorece el desarrollo de embriones de ovocitos madurados. En cuanto a la relación de embriones producidos por ovocitos fertilizados, los resultados de esta investigación son superiores, a los reportados por (Yoneda et al. 2004) quienes evaluaron el efecto de la concentración de oxígeno en el desarrollo de embriones porcinos *in vitro*, en la que obtuvieron un 25% de embriones en la concentración de 5% de O₂ y 19.3% en la concentración de 20% de O₂.

Lo anterior demuestra que la concentración de oxígeno para la producción *in vitro* de embriones bovinos influye en el porcentaje de ovocitos madurados, fertilizados, el clivaje y embriones obtenidos.

Cuadro 12

Eficiencia en la producción in vitro de embriones bovinos, relacionando los embriones producidos con

los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje utilizando dos concentraciones de oxígeno (5% y 20%).

Tratamiento	Embriones/ ovocitos viables (%)	Embriones/ ovocitos maduros (%)	Embriones/ovocitos fertilizados (%)	Embriones/ ovocitos en clivaje (%)
20 % de oxígeno	23.91	27.93	34.96	51.1
5 % de oxígeno	29.44	38.83	54.64	68.83
CV	8.163	19.3031	19.2392	14.5067
Probabilidad	0.0865	0.0045	0.0001	0.001

Nota. CV: Coeficiente de variabilidad

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, los mejores porcentajes por etapas de maduración y fertilización *in vitro* se obtuvieron con la concentración de 20% de O₂.

Los mayores porcentajes de clivaje, embriones y blastocitos se obtuvieron con la concentración de 5% de O₂

Sin embargo, la concentración de 5% de O₂, mostró tener al final del procedimiento de PIV la mejor eficiencia al relacionar el porcentaje de embriones producidos con los porcentajes de maduración, fertilización y clivaje.

Recomendaciones

Bajo las condiciones de este estudio se recomienda evaluar la aplicación de la concentración de 20% de O₂ en las etapas de maduración y fertilización *in vitro* y 5% de O₂ para la etapa del cultivo *in vitro* en el laboratorio de reproducción animal de Zamorano.

Realizar futuras investigaciones evaluando la concentración del 10% de O₂ en las etapas de maduración y fertilización *in vitro*.

Referencias

- Arias ME, Sanchez R, Felmer R. 2012. Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced *in vitro*. *Zygote*. 20(3):209–217. Eng. doi:10.1017/S0967199411000025.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried Rutledge ML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45(5):943–956. eng. doi:10.1016/0093-691X(96)00024-6.
- Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thompson JG. 2007. Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. *Human reproduction*. 22(10):2768–2775. eng. doi:10.1093/humrep/dem203.
- Caicedo JE. 2008. Aplicaciones de la aspiración folicular - fertilización in-vitro en bovinos y factores que pueden afectar su eficiencia [Trabajo monográfico]. Colombia: Universidad de La Salle; [consultado el 10 de mar. de 2021]. https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1000&context=esp_biotechnologia_reproduccion.
- Cetica PD, Pintos LN, Dalvit GC, Beconi MT. 2001. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. *IUBMB Life*. 51(1):57–64. eng. doi:10.1080/15216540119253.
- Corrêa G, Rumpf R, Duarte Mundim T, Machaim Franco M, Nunes Dode M. 2008. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*. 104(2-4):132–142. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.02.002.
- Dias Gonçalves P, Barreta M, Sandri L, Ferreira R, Quites antoniazzi A. 2007. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*; [consultado el 2 de ago. de 2020]. 31(2):212–217. port. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/212.pdf>.
- Fischer B, Bavister BD. 1999. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*. 99(2):673–679. eng. doi:10.1530/jrf.0.0990673.
- Georges M. 2006. Application of biotechnology for the genetic improvement of livestock: status and prospects. Bélgica: University of Liège; [consultado el 2 de ago. de 2020]. <https://cutt.ly/9QYB2cZ>.
- Gonella Diaza AM, Atuesta Bustos JE, Bernal Ulloa SM, Chacon Jaramillo L. 2013. Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. *Revista de investigación agraria y ambiental*; [consultado el 20 de ago. de 2020]. 4(1):65–79. esp. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/39-generalidades_de_la_produccion.pdf.
- Hafez E. 1989. Folículoogénesis, maduración del óvulo y ovulación. En: Hafez E, editor. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 5ª ed. México: Mc Graw Hill. p. 142–158.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N. 2000. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*. 57(4):353–360. doi:10.1002/1098-2795(200012)57:4<353:AID-MRD7>3.0.CO;2-R.

- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47(1):23–32. doi:10.1016/S0093-691X(96)00336-6.
- Khurana NK, Niehmann H. 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*. 54(5):741-563. doi:10.1016/S0093-691X(00)00387-3.
- Leibfried L, First N. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*. 48(1):76–78. doi:10.2527/jas1979.48176x.
- Leivas F, Brum D, Saliba W, Alvim M, Bernardi M, Rubin M, Silva C. 2006. Oxygen tension in IVM and IVF of bovine oocytes: effect on embryonic development and pregnancy rate. *Animal Reproduction*; [consultado el 14 de may. de 2021]. 3(4):439–445. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6083f7783717068b47de>.
- Loneragan P, Rizos D, Ward F, Boland MP. 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev*. 41(5):427–437. eng. doi:10.1051/rnd:2001142.
- Mantilla Cabrera M. 2012. Fecundación *in vitro* como alternativa para el mejoramiento genético en bovinos [Tesis]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 90 p; [consultado el 3 de ago. de 2020]. <http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/2104>.
- Marizancén Silva MA, Artunduaga Pimentel L. 2017. Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *Revista de investigación agraria y ambiental*. 8(2):247–259. doi:10.22490/21456453.2050.
- Neil Vásquez A, Gomez J, Álvarez J, Chavarría N. 2009. Comparación de dos métodos de incubación sobre la maduración *in vitro* de oocitos bovinos. *Politécnica*. 5(8):26–32. esp. doi:10.33571/rpolitec.
- Palma G. 2001. Producción *in vitro* de embriones bovinos. INTA; [consultado 02 de ag. de 2020]. 225–294. https://www.researchgate.net/profile/Gustavo_Palma/publication/329567703_Produccion_in_vitro_de_embryones_bovinos/links/5c0fceb92851c39e54298/Produccion-in-vitro-de-embryones-bovinos.pdf.
- Palma GA. 2001. *Biología de la reproducción*. 1ª ed. Argentina: INTA. 701 p. ISBN: 9874337796.
- Peláez Peláez VA. 2011. Producción *in vitro* de embriones bovinos [Monografía]. Ecuador: Universidad de Cuenca. 86 p; [consultado el 3 de ago. de 2020]. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. 1995. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 44(4):471–477. doi:10.1016/0093-691X(95)00219-X.
- Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N, Parrish J, Memili E. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science*. 101(3-4):225–240. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.09.016.

- Sánchez BM. 2014. Comparación de dos medios de cultivo *in vitro*: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 33 p; [consultado el 23 de may. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/3494/1/CPA-2014-077.pdf>.
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR. 1990. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil.* 89(2):573–578. eng. doi:10.1530/jrf.0.0890573.
- Vásquez N, Torres V, Rojano B. 2014. Efecto del ácido ascórbico durante maduración *in vitro* de oocitos bovinos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y competencia para el desarrollo embrionario. *Información tecnológica.* 25(2):141–150. doi:10.4067/S0718-07642014000200016.
- Yoneda A, Suzuki K, Mori T, Ueda J, Watanabe T. 2004. Effects of delipidation and oxygen concentration on *in vitro* development of porcine embryos. *J Reprod Dev.* 50(3):287–295. eng. doi:10.1262/jrd.50.287.
- Yuan YQ, van Soom A, Coopman FO, Mintiens K, Boerjan ML, van Zeveren A, Kruif A de, Peelman LJ. 2003. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology.* 59(7):1585–1596. doi:10.1016/S0093-691X(02)01204-9.

Anexos

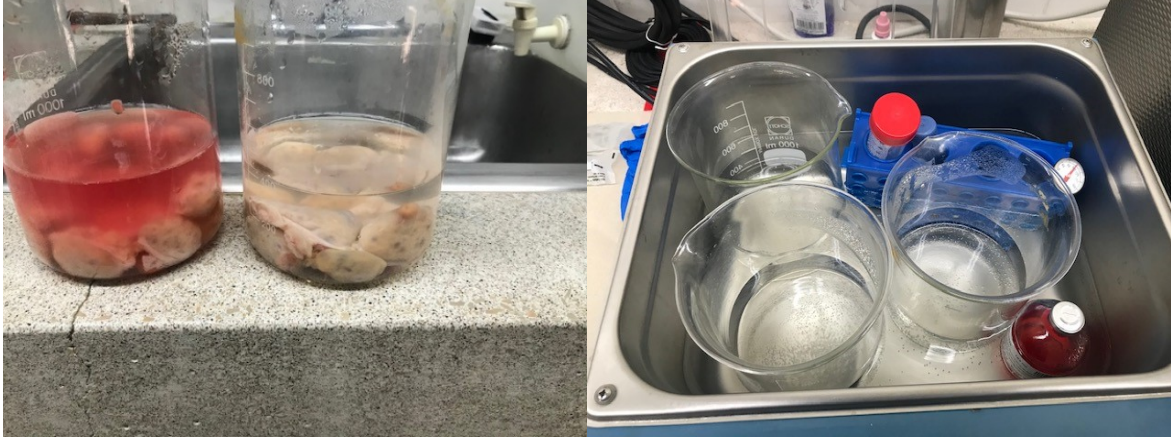
Anexo A

Recolección de ovarios.



Anexo B

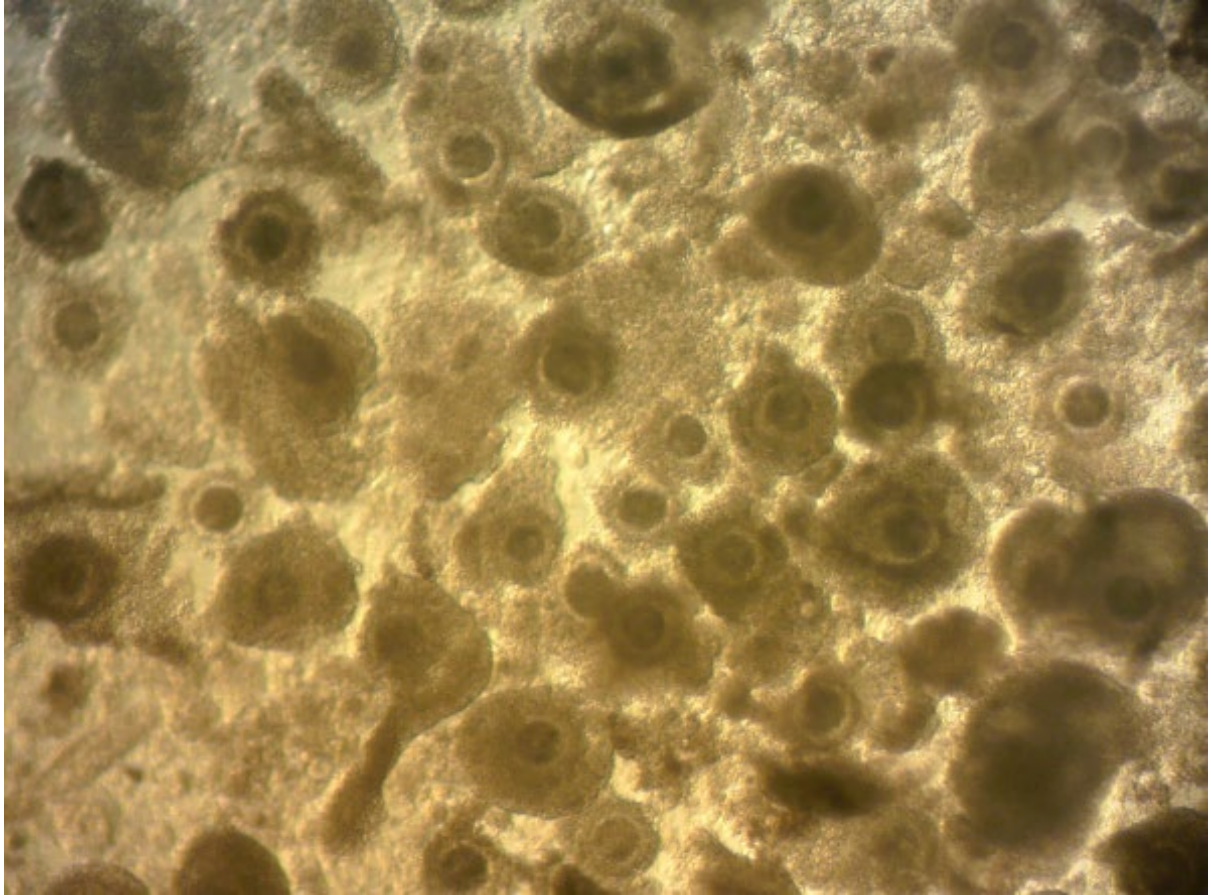
Acondicionamiento de ovarios.



Anexo C

Aspiración Folicular.



*Anexo D**Búsqueda ovocitos viables.*

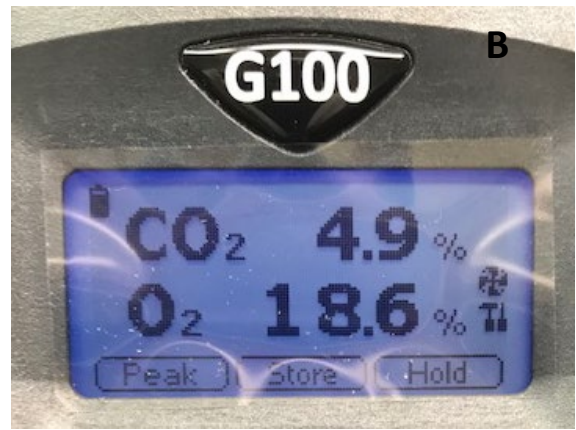
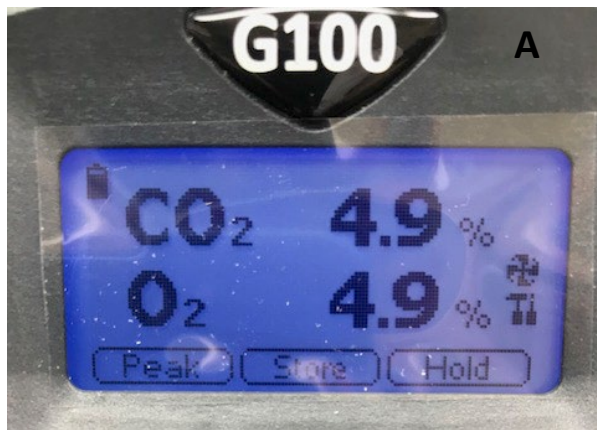
Anexo E

Instrumentos utilizados.



Anexo F

Tratamientos. A) FIV 5% O₂ B) FIV 20% O₂



Anexo G

Microgotas flotantes para maduración in vitro.

