Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

Ingeniería Agronómica

Proyecto Especial de Graduación

Producción *in vitro* de embriones bovinos utilizando Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) en el medio de maduración

Estudiantes

Bryan José Mendoza Muñoz

Jeniffer Pamela Jiron Laguna

Asesores

John Jairo Hincapié, D.Sc.

Rogel Castillo, M.Sc.

Honduras, junio 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA ODILA TREJO

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros 5

Índice de Figuras 6

Índice de Anexos 7

Resumen 8

Abstract 9

Introducción 10

Materiales y Métodos 14

Localización 14

Día -1 14

Recolección de Ovarios 14

Etapa de Acondicionamiento de los Ovarios 14

Etapa de Aspiración Folicular y Recolección de los Ovocitos 14

Día 0 18

Fertilización in vitro (FIV) 18

Acondicionamiento del Semen por Centrifugación en Gradientes de Percoll 45-90% 19

Descongelación del Semen 19

Día 1 20

Cultivo in vitro 20

Tratamientos 21

Variables analizadas 21

Diseño Experimental y Análisis Estadístico 22

Resultados y Discusión 23

Recolección de Ovocitos 23

Porcentaje de Maduración *in vitro* (MIV) 24

Porcentaje de Fertilización *in vitro* (FIV) 25

Porcentaje de Clivaje y Apoptosis 27

Porcentaje de Embriones, Mórulas y Blastocistos 29

Eficiencia General 31

Conclusiones 33

Recomendaciones 34

Referencias 35

Anexos 39

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Protocolo Minitube para el Medio de Colección de Ovocitos (MCO) 16

Cuadro 2 Solución madre del Medio de Maduración de Ovocitos (MMO) TCM-199 Parker (MPM stock). 16

Cuadro 3 Suplementación de la solución madre del medio TCM-199 Parker 16

Cuadro 4 Protocolo para la preparación del medio de fertilización (FIV)..... 18

Cuadro 5 Protocolo Minitube para la preparación del medio de cultivo SOF (Fluido Sintético de Oviducto)..... 20

Cuadro 6 Porcentajes de ovocitos viables y maduros utilizando ITS en el medio de maduración in vitro 25

Cuadro 7 Porcentaje de ovocitos fertilizados, en clivaje y apoptosis, utilizando ITS en el medio de maduración in vitro. 26

Cuadro 8 Porcentaje de embriones, mórulas y blastocistos utilizando ITS en el medio de maduración in vitro 30

Cuadro 9 Eficiencia del procedimiento de producción de embriones in vitro, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje, con ITS y control en el medio de maduración..... 32

Índice de Figuras

Figura 1 Ovocitos obtenidos posterior a la aspiración folicular. 24

Figura 2 A) Ovocitos no madurados; B) Ovocitos madurados a las 24 horas 25

Figura 3 A) Cigotos sin clasificar; B) ovocitos fecundados (Control). Nótese la línea de clivaje 27

Figura 4 A) Cigotos sin clasificar; B) ovocitos fecundados (ITS). Nótese la presencia del segundo cuerpo polar 27

Figura 5 Clivaje control a las 72 horas 28

Figura 6 Clivaje ITS a las 72 horas 29

Figura 7 Mórulas y blastocistos a los 8-9 días 30

Índice de Anexos

Anexo A Instrumentos dentro de la cámara de flujo laminar 39

Anexo B Preparación de los ovarios 40

Anexo C Aspiración folicular 41

Anexo D Placa de búsqueda de ovocitos viables 41

Anexo E Embriones protruidos 41

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivos: Determinar los porcentajes *in vitro* de maduración, fertilización, clivaje y embriones (mórulas y blastocistos), como también determinar la eficiencia del proceso de producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos a partir de la suplementación con Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) en el medio de maduración *in vitro*. Se utilizaron 179 ovocitos viables para el medio de maduración (MMO) + ITS y 146 para el MMO sin ITS (control). Se encontraron diferencias significativas (P ≤0.05) en los porcentajes de ovocitos madurados con valores de 90.50% y 81.51% para el tratamiento con ITS y control respectivamente. Luego de la fertilización de los ovocitos, los porcentajes de clivaje (P ≤0.05) fueron de 84.89% y 71.43% y de apoptosis 15.11% y 28.57% para el tratamiento con ITS y para el control respectivamente. Al octavo día el porcentaje de embriones producidos (P ≤0.05) fueron de 60.17% y 41.54% de los cuales se encontraban en estado de blastocisto el 87.32% y 62.96%; para el tratamiento con ITS y el control respectivamente (P ≤0.05). La eficiencia general en la producción de embriones por ovocito viables, madurados, fertilizados y clivaje, los valores más altos fueron para los ovocitos madurados con ITS; con porcentajes de 39.66%, 43.83%, 51.08% y 60.17%, respectivamente. Se concluye que el MMO más ITS es el que produjo mayor porcentaje de ovocitos madurados, con un nivel superior de competencia y división celular y, por lo tanto, produciendo una mayor cantidad de embriones con altos porcentajes de blastocistos.

Palabras clave: Biotecnología, embriones, fertilización, *in vitro*, ovocitos.

Abstract

The present study had as objectives: Determine the *in vitro* percentages of maturation, fertilization, cleavage, and embryos (morulae and blastocysts), as well as to determine the efficiency of the *in vitro* production process (PIV) of bovine embryos from the supplementation with Insulin -Transferrin-Selenium (ITS) in the *in vitro* maturation medium. For the maturation medium (MMO) 179 viable oocytes were used + ITS and 146 for the MMO without ITS (control). Significant differences (P ≤0.05) were found in the percentages of matured oocytes with values of 90.50% and 81.51% for treatment with ITS and control, respectively. After the fertilization of the oocytes, the percentages of cleavage (P ≤0.05) were 84.89% and 71.43% and of apoptosis 15.67% and 28.57% for the treatment with ITS and for the control, respectively. On the eighth day, the percentage of embryos produced (P ≤0.05) were 60.17% and 41.54%, of which 87.32% and 62.96% were in the blastocyst stage; for treatment with ITS and treatment without ITS, respectively (P ≤ 0.05). The general efficiency in the production of viable, matured, fertilized and cleavage embryos per oocyte, the highest values were for oocytes matured with ITS; with percentages of 39.66%, 43.83%, 51.08% and 60.17%, respectively. It is concluded that the MMO plus ITS is the one that produced the highest percentage of matured oocytes, with a higher level of competition and cell division and, therefore, producing a higher percentage of blastocysts and a greater number of embryos.

Keywords: Biotechnology*,* embryos, fertilization, *in vitro*, oocytes.

Introducción

Durante los últimos años la biotecnología ha tomado fuerza en la producción y mejoramiento genético animal, gracias a los distintos avances en esta área, se ha logrado obtener resultados sobresalientes en la explotación pecuaria. Fernández et al. (2007) afirman que en las últimas décadas la biotecnología animal ha experimentado un gran auge y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados: Los mamíferos. El desarrollo de nuevas biotecnologías para producir animales transgénicos, o para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones (Fernández et al. 2007).

En tal sentido, la biotecnología de la reproducción comprende técnicas como: Inseminación artificial y preservación de semen, usadas para el mejoramiento genético del ganado; sexado de espermatozoides, superovulación, transferencia de embriones, producción de embriones *in vitro* y clonación, aumentando la eficiencia reproductiva y la tasa de reproducción (Crespo Calva y Guamán Gutiérrez 2015).

Todas las herramientas y/o técnicas utilizadas en la biotecnología, han sido de gran ayuda en la actualidad, puesto que han abierto el camino hacia el desarrollo de nuevas y modernas técnicas como la producción *in vitro* de embriones que comenzó por la producción de embriones *in vivo.* La producción *in vitro* (PIV) de embriones comprende varios procesos fundamentales: La maduración ovocitaria, la capacitación espermática, la fecundación *in vitro* y por último, el desarrollo embrionario (García-Díaz et al. 2013).

Los reportes indican que el uso de la PIV ha venido creciendo de manera considerable en los últimos años. La International Embryo Technology Society IETS (2015) señaló, en el informe anual de datos recogidos a nivel mundial, que durante este año reportaron 630.202 embriones producidos *in vitro* y transferidos, en contraste con los resultados del año 2001 en

donde se transfirieron 109.205 embriones. Lo que representa un incremento alrededor del 500%, evidenciando una mayor demanda de esta biotecnología (Vélez et al. 2017).

Todo el sistema de producción *in vitro* requiere la maduración de los ovocitos, de cuyo éxito depende una buena fertilización (Carazas Loayza y Ayala Vargas 2019). A su vez, la fecundación resume los eventos iniciados por la penetración del espermatozoide a través de las diferentes capas celulares y acelulares que rodean al ovocito y culminan con la formación de ambos pronúcleos (Palma 2001). Por consiguiente, según Rizos et al. (2002), el cultivo embrionario desde cigoto hasta blastocisto es crítico para la PIV de embriones, además que durante este período se define en gran medida, la calidad de los embriones obtenidos.

Por otra parte, para un buen desarrollo del embrión, se necesita que el ovocito adquiera una adecuada competencia ovocitaria, definida como la capacidad del ovocito para someterse a una maduración citoplasmática y nuclear, fertilización y desarrollo exitoso del embrión (Reader et al. 2017). Del mismo modo, según Sirard et al. (2006), los ovocitos poseen varios niveles de competencia de desarrollo: capacidad para reanudar la meiosis; capacidad de dividirse después de la fertilización; capacidad para desarrollarse hasta la etapa de blastocisto; capacidad para inducir una preñez y capacidad para desarrollarse con buena salud.

En la maduración *in vitro* es importante poder brindarle todas las condiciones necesarias al ovocito, para que logren una buena competencia ovocitaria y se pueda desarrollar de la mejor manera en sus siguientes etapas. Tal como afirman Avery et al. (2003), el éxito de la fertilización, clivaje y desarrollo embrionario presenta estricta relación de la competencia adquirida durante el proceso de maduración *in vitro* del ovocito.

En estudios realizados por Hyttel et al. (1997), caracterizan la competencia de los ovocitos bovinos en relación con las etapas secuenciales del desarrollo folicular y, por ovocitos de los folículos antrales tempranos, en relación con su diámetro. A su vez en el área porcina, factores como la alta concentración de oxígeno durante la maduración *in vitro* y el bajo nivel de

oxígeno durante el cultivo *in vitro* pueden alterar la expresión de múltiples genes relacionado con la competencia de los ovocitos y mejora significativamente el desarrollo del embrión (Kang et al. 2012)

El adicionar ITS (Insulina-Transferrina-Selenio) en el medio de maduración favorece el crecimiento celular y el porcentaje de blastocistos (AIDA 2009). Por otro lado, en comparación con la adición de otros suplementos en el medio de maduración, como lo es el uso de suero fetal bovino, siendo este uno de los suplementos más primitivos, altera tanto la morfología embrionaria, como su calidad. A partir de esto, su eliminación o reemplazo posibilita la producción de embriones de buena calidad para ser crio preservados y transferidos (Mucci et al. 2006).

La insulina, por su parte, induce la captación de glucosa y aminoácidos, a su vez presenta una actividad mitógena y anti apoptótica aumentando los índices de clivaje y blastocistos en bovinos (Augustin et al. 2003). La Transferrina y el selenio son oligoelementos que tienen características antioxidantes. La combinación de estos dos elementos, en el cultivo de células, provoca una reducción en la producción de radicales libres y peroxidación de lípidos (Kim S et al. 2005); además su presencia potencia enormemente la maduración de los ovocitos, disminuye en gran medida, la polispermia y aumenta la formación de pronucleares.

Estudios realizados por Fouladi-Nashta y Campbell (2006), demostraron que la presencia de insulina en el medio tiene una serie de efectos sobre el ovocito inmaduro, incluyendo cambios en el perfil proteico y la ultraestructura. Por otra parte, estos autores mencionaron que la adición de insulina ya sea sola o en combinación con transferrina y selenio, ayuda en la mejora del crecimiento celular y el incremento en el porcentaje de blastocistos.

A su vez, otros estudios realizados por Bowles y Lishman (2009), reportaron que la inclusión de transferrina e insulina en el medio de cultivo *in vitro* de embriones bovinos aumentó significativamente el porcentaje y el número de blastocistos que se formaron.

Asimismo, en la investigación de Barrio et al. (2003), se obtuvieron resultados superiores en el medio de cultivo cuando este fue suplementado con ITS. A su vez afirmaron que, el porcentaje de zigotos que se dividen a las 48 horas fue superior cuando el medio estaba suplementado con ITS, frente al cultivo de estos en un medio no definido, suplementado con suero fetal bovino y células del epitelio oviductal bovino (FCS+BOEC).

Una combinación de insulina, transferrina y selenio (ITS), proporciona mejores índices de energía nuclear y maduración citoplasmática de ovocitos porcinos (Hu et al. 2011) así como en PIV de embriones bovinos (Dalvit et al. 1998).

Dado los beneficios mencionados anteriormente de utilizar ITS en la producción *in vitro* de embriones, se establecieron los siguientes objetivos:

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar el efecto de la Insulina-Transferrina-Selenio en el medio de maduración sobre la producción de embriones *in vitro* en bovinos. Los objetivos específicos fueron determinar los porcentajes *in vitro* de maduración, fertilización, clivaje y embriones (mórulas y blastocistos) a partir de la suplementación con Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) en el medio de maduración y determinar la eficiencia del proceso de producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos.

Materiales y Métodos

Localización

La investigación se llevó a cabo entre agosto 2021 a marzo 2022 en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada a 32 km de Tegucigalpa, con un promedio de altura sobre el nivel del mar, temperatura anual y precipitación de 800 m, 24 °C y 1100 mm respectivamente.

Día -1

Recolección de Ovarios

Los ovarios fueron recolectados de hembras bovinas faenadas en la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA), ubicada a 5 km de las instalaciones del laboratorio. Se utilizó solución salina fisiológica (SSF 0.9% NaCl) atemperada a entre 20-25 °C y suplementada con 0.5 g/litro y 100,000 UI/litro de estreptomicina y penicilina respectivamente, para el transporte de los ovarios hacia el laboratorio en un tiempo no mayor a 6 horas desde su recolección.

Etapa de Acondicionamiento de los Ovarios

Durante esta etapa se eliminaron los restos de tejidos adheridos a los ovarios (restos de grasa, cuernos uterinos, trompas uterinas) y simultáneamente se realizaron tres lavados en SSF 0.9% NaCl atemperada a 35 °C.

Todos los medios que se utilizaron en las diferentes etapas del proceso PIV fueron preparados, atemperados a 38 °C y equilibrados en las incubadoras un mínimo de cuatro horas antes de iniciar las respectivas maniobras.

Etapa de Aspiración Folicular y Recolección de los Ovocitos

Se procedió a la punción de los folículos entre 2-10 mm de diámetro, utilizando agujas de 18 x 1 ½ g y jeringa de 5 mL de dos piezas. La importancia de los elementos de punción y

aspiración (diámetro de la aguja, presión de aspiración, entre otros) determinan en buena medida la calidad de los ovocitos recolectados y la eficiencia del sistema de aspiración. Por lo tanto, a medida que se incrementa la presión de aspiración, aumenta la tasa de recuperación, pero al mismo tiempo, aumenta la cantidad de ovocitos desnudos por lo tanto disminuye la calidad de los ovocitos recolectados.

Una vez se llenó cada tubo de policarbonato de 50 mL con el fluido folicular, permanecieron en reposo durante 10-15 minutos con el propósito de que los complejos *cumulus*-ovocitos decanten y formen un pellet en el fondo del tubo. Transcurrido ese tiempo, el pellet fue recolectado con pipeta Pasteur y colocado sobre una placa Grid de búsqueda.

Los complejos *cumulus*-ovocitos seleccionados categoría I y II Minitube (s.f.) (ovocitos categoría I y II: más de tres filas de células del *cumulus oophorus*, zona pelúcida íntegra y citoplasma homogéneo y oscuro) fueron lavados al menos tres veces mediante el pasaje a través de gotas de medio de maduración MMO sobre placas de Petri. El objetivo de este lavado fue la eliminación del fluido folicular, restos celulares y otros detritus, así como algunos posibles contaminantes provenientes de la sala de punción. Una vez se lavaron y seleccionaron, fueron colocados en grupos de 10 ovocitos/microgota flotante de 100 µl en las placas de maduración previamente elaboradas y puestos a cultivar en incubadora a 38.5 °C, 20% de O_2, 5% de CO_2 y humedad a saturación.

Se utilizaron microgotas flotantes de 100 µl de MMO conservando una relación de 10 µl/ovocito cubiertas con aceite mineral (el objetivo fue evitar la deshidratación de los medios, pese a que las incubadoras brindan un ambiente con máxima humedad relativa, las microgotas por presentar una alta relación superficie/volumen, tienden a deshidratarse durante la incubación) en placa Petri de 35 mm, y equilibradas en la incubadora a 20% O_2 y 5% CO_2, 38.5°C. Se utilizó el medio de colección de ovocitos Minitube MCO 19990/0050® (Cuadro 1).

Cuadro 1

Protocolo Minitube para el Medio de Colección de Ovocitos (MCO).

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

Nota. Atemperar a 38 °C, 4 horas antes de realizar la maniobra.

EFAF: Libre de ácidos grasos por sus siglas en inglés

Se utilizó como medio de maduración de ovocitos el medio TCM-Parker (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 2

Solución madre del Medio de Maduración de Ovocitos (MMO) TCM-199 Parker (MPM stock).

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

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

El día de la maniobra de aspiración y recolección de los ovocitos, se suplementó la solución madre (Cuadro 3).

Cuadro 3

Suplementación de la solución madre del medio TCM-199 Parker.

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

Nota. MPM: Medio Parker de Maduración

Para efectos de la investigación se le adicionaron 50 µL de Insulina-Transferrina-Selenio (ITS Sigma-Aldrich I3146) a 10 mL de TCM-199 Parker suplementado.

La Insulina-Transferrina-Selenio (ITS Sigma-Aldrich I3146) contiene 1.0 mg/mL de insulina humana recombinante, 0.55 mg/mL de transferrina humana (sustancialmente libre de hierro) y 0.5 µg/mL de selenito de sodio a una concentración de 100x.

ITS es una mezcla de insulina humana recombinante, transferrina humana y selenito de sodio. Es un suplemento celular general diseñado para su uso en medios no complejos (por ejemplo, MEM, RPMI-1640) y medios complejos (por ejemplo, Ham S F-12, DME / F-12, MEM) con piruvato de sodio.

Se aspiraron los folículos con un diámetro aproximado entre 2 y 10 mm, utilizando jeringas de dos piezas y agujas 18 x 1 ½ pulgadas. El líquido folicular fue depositado en un tubo de 50 mL de policarbonato estéril y atemperado en baño maría; terminado el proceso de aspiración, se dio un tiempo aproximado de 10 minutos para facilitar la decantación de los presuntos complejos *cumulus*-ovocitos (COC), una vez cumplido el tiempo estipulado se procedió a eliminar en forma muy delicada el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur dejando solo 5-7 mL de líquido folicular en el fondo para luego verterlo a una placa grid de búsqueda atemperada e iniciar la búsqueda en el estereoscopio a 4x y simultáneamente clasificar y seleccionar los ovocitos además de lavarlos tres veces en MMO para luego depositarlos en las microgotas flotantes previamente preparadas y equilibradas; se lavó el tubo con medio MCO a fin de recuperar los posibles ovocitos que hayan quedado adheridos al tubo. Colocar nuevamente las placas en la incubadora a 38 °C, 20% O_2, 5% CO_2 y humedad relativa a saturación (95%) por 24 horas.

Los ovocitos fueron divididos al azar en dos grupos: madurados en medio suplementado con ITS y la otra mitad fueron el control.

Día 0

Fertilización in vitro (FIV)

A las 24 horas de iniciado el proceso de maduración (las 24 horas se cuentan a partir de que se aspiró el primer ovario), se procedió a la fecundación de los ovocitos, para lo cual se utilizó semen congelado-descongelado.

Al inicio de las maniobras de este día, se retiraron las placas de maduración y se observó la coloración del medio (el rojo fenol, ante una disminución de pH, común en caso de contaminación bacteriana, el medio cambiará al amarillo), presencia de hongos, y aspecto de los ovocitos (expansión). Una vez verificado estos aspectos, se continuó con el siguiente proceso de acondicionamiento, capacitación y fecundación:

Se cargaron nuevas placas de cultivo nunc con medio de fecundación FIV (Minitube 19990/0030®; Cuadro 4). De acuerdo con este protocolo, se colocarán 600 µl de medio de fecundación/pozo, no se cubrieron con aceite mineral, y se equilibró cuatro horas antes en la incubadora 38 °C, 20% O_2, 5% CO_2 y humedad relativa a saturación (95%). Posteriormente, se colocaron en estas placas, los ovocitos que fueron puestos a madurar el día anterior, lavados previamente dos veces en medio FIV.

Cuadro 4

Protocolo para la preparación del medio de fertilización (FIV).

Ingrediente	Unidades
Solución stock Fertilización Minitube 19990/030®	10 mL
Suero Albúmina Bovino EFAF	60 mg
Piruvato de sodio	100 µl
Heparina	200 µl

Nota. Esterilizar por filtración a 0.22 µm. Equilibrar en la incubadora 38 °C, 20% O_2, 5% CO_2 y humedad relativa a saturación (95%).

Acondicionamiento del Semen por Centrifugación en Gradientes de Percoll 45-90%

Esta etapa tiene como objetivo eliminar diluyentes, células muertas, plasma seminal. Para el desarrollo de esta etapa se utilizaron los protocolos/medios Minitube. Se depositaron 10 mL del medio de capacitación en dos tubos de 15 mL rotulados como "lavado"; equilibrados durante dos horas en la incubadora a 38 °C, 20% O_2, 5% CO_2 y humedad relativa a saturación (95%).

Se depositaron 3 ml de Percoll 90% en un tubo de 15 mL, equilibrados a 38 °C, 20% O_2, 5% CO_2 y humedad relativa a saturación (95%) cuatro horas antes de la maniobra de FIV.

Una hora antes que se inició el procedimiento de FIV, mediante la técnica de sotoposición, se colocaron lentamente 3 mL de Percoll 90% en el fondo del tubo que contenía 3 mL de Percoll 45%, y fue colocado en la incubadora.

Descongelación del Semen

El semen congelado en pajuela se descongeló en baño María a 30-35 °C, durante 45 segundos. Posteriormente, y una vez secadas las pajuelas (se utilizaron 3 pajuelas del mismo toro), se armó la pistola de inseminación, y se depositó el semen lentamente sobre el gradiente de Percoll 45-90% y luego se centrifugó a 38 °C durante 10 minutos a 1000 g, se retiró el pellet que contiene los espermas vivos del fondo del tubo con una pipeta Pasteur y se depositó en el tubo de "lavado" y centrifugado a 200 g y 38°C durante 10 minutos, luego se retiró el sobrenadante suavemente dejando 0.5 mL que contienen el pellet con los espermatozoides. Posteriormente se realizó el cálculo de la concentración utilizando el espectrofotómetro Spermacue® y con el resultado se calculó la dosis inseminante garantizando una concentración de 1 x 10^6 espermas/mL de medio, recomendando una concentración aproximada de 4,000-8,000 espermas/ovocito. Una vez realizado el proceso de mezcla de los espermatozoides con los ovocitos madurados, se llevó a co-cultivo durante 18 horas en la incubadora.

Día 1

Cultivo in vitro

Eliminación de las Células del *cumulus oophorus* (desempaque).

Transcurridas 18 horas de la fecundación, los presuntos cigotos (cigotos putativos: presencia del segundo cuerpo polar y/o inicio de clivaje) fueron lavados en medio de cultivo SOF (Cuadro 5), para la eliminación de las células del *cumulus*, y colocados en nuevas placas de cultivo nunc con 400 µl de medio SOF cubiertos con aceite mineral (estas placas fueron preparadas y puestas a equilibrar en la incubadora con dos horas mínimo de anticipación al inicio de la maniobra) y colocadas en la incubadora a 38.5 °C, 5% de O_2, 5% de CO_2, 90% de N_2 y humedad relativa a saturación.

Cuadro 5

Protocolo Minitube para la preparación del medio de cultivo SOF (Fluido Sintético de Oviducto).

Ingrediente	Unidades
Solución stock 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

Desempaque/denudación (eliminar las células del *cumulus oophorus*).

1. Se colocaron los presuntos ovocitos fecundados (cigotos putativos) en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 900 µl de SOF + 100 µl de Hialuronidasa atemperada (se utilizó un tubo para cada tratamiento).

2. Luego, se dejaron sedimentar durante 5 minutos en la incubadora a 38 °C.

3. Se eliminó lentamente 700 µl del sobrenadante.

4. Se agitó en el vórtex durante tres minutos.

5. Posteriormente, se depositó el contenido en una placa Petri X con gotas de 800 µl de SOF en los cuatro pozos. Luego se lavaron las paredes del tubo con medio de cultivo descargándolo en la placa para la búsqueda. Es necesario realizar varios lavados y búsquedas del tubo eppendorf hasta que no aparezcan más cigotos (2 o 3 veces). Observar el tubo bajo lupa para detectar la posible presencia de cigotos adheridos a su pared.

6. Lavado y clasificación de: ovocitos fecundados aquellos que presentaron la expulsión del segundo cuerpo polar y/o iniciaron clivaje

7. Se depositaron en la placa de cultivo con medio SOF (relación 1 ovocito: 10 µl de SOF).

8. Se colocaron nuevamente las placas en la incubadora a 5% de CO_2, 5% de O_2, 90% de N_2 y humedad relativa a saturación durante siete días.

Cultivo

A las 72 horas se realizó una evaluación para determinar la tasa de división celular (clivaje) y suplementación con 10% de Suero Fetal Bovino (10 µl/gota).

Al día siete se evaluó la tasa de producción de mórulas y blastocistos, utilizando la siguiente fórmula:

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

Tratamientos

Se realizó dos tratamientos:

Medio de Maduración *in vitro* suplementado con ITS (50 µl/10 mL de MMO)

Medio de Maduración *in vitro* sin suplementar (control)

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)

Eficiencia general

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (MIV + ITS y MIV control) y 179 y 146 ovocitos para los tratamientos ITS y control respectivamente. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) aplicando el programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS® 2014 versión 9.4), con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$.

Resultados y Discusión

Recolección de Ovocitos

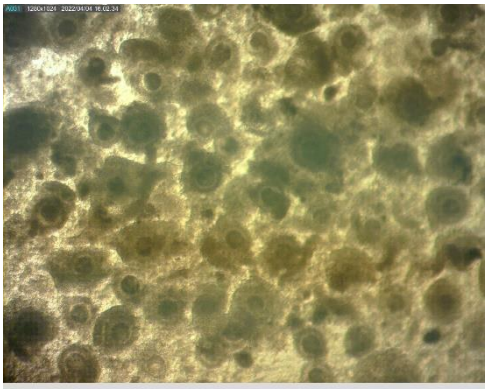
Los ovocitos fueron extraídos de ovarios de vacas post mortem utilizando la técnica de aspiración folicular, se logró extraer 370 ovocitos de 60 ovarios, los cuales fueron clasificados logrando obtener el 88% (325) de ovocitos viables (Figura 1), descartando un 12% de ovocitos degenerados. Los ovocitos fueron distribuidos para los dos tratamientos utilizando 179 y 146 ovocitos viables para el tratamiento ITS y el control respectivamente.

La eficiencia en la cantidad de ovocitos obtenidos mediante la aspiración folicular dependerá del dominio de la técnica de aspiración por parte del operador (Scott et al. 1994). Bajo las condiciones de este estudio, se obtuvo una media de 5.4 ovocitos viables por ovario aspirado, valores que superan a los obtenidos por Quispe et al. (2018), en la cual recolectaron 5.02 ovocitos por ovario, utilizando la técnica de aspiración folicular. Estas diferencias se atribuyen posiblemente a diversos factores que influyen en el número de ovocitos recolectados, tales como los tratamientos hormonales, número de aguja de punción, frecuencia de la aspiración, presión de vacío, resolución del equipo utilizado, tamaño de los folículos y la raza del animal (Merton et al. 2003).

Se clasificaron los ovocitos en cuatro categorías, categoría I los que estaban rodeados completamente con más de tres capas de células del *cumulus oophurus*, el citoplasma uniformemente granulado, compacto y zona pelúcida intacta. Categoría II los que presentaban de dos a tres células de *cumulus oophurus*, citoplasma no homogéneo y zona pelúcida intacta. Categoría III aquellos que presentaban al menos una capa del *cumulus oophurus*, parcialmente desnudos, citoplasma no homogéneo. Categoría IV completamente desnudos y citoplasma irregular (Quispe et al. 2018). Solo los ovocitos categoría I y II fueron sometidos a los tratamientos, mientras que la categoría III y IV fueron descartados.

Figura 1

Ovocitos obtenidos posterior a la aspiración folicular.



Porcentaje de Maduración *in vitro* (MIV)

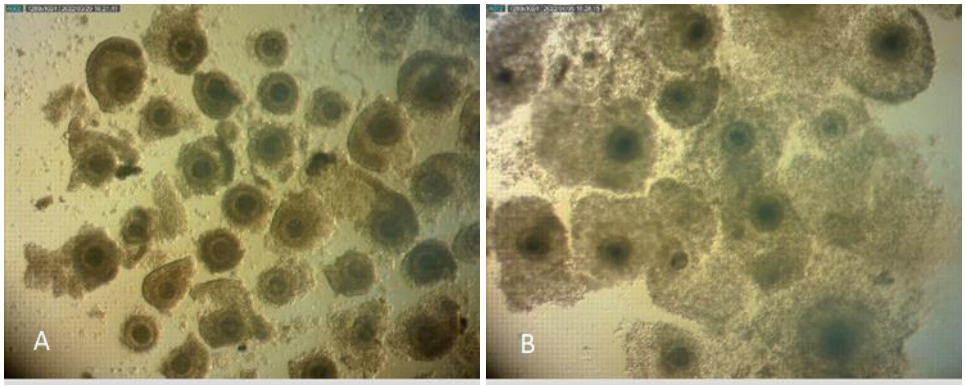
El proceso de maduración *in vitro* busca la maduración exitosa de los ovocitos que, representa la tercera fase de la ovogénesis donde ocurren eventos nucleares, meióticos y citoplasmático. En estos últimos, incluyen cambios morfológicos de la membrana celular, siendo todos ellos necesarios para que los ovocitos sean capaces de ser fecundados y, posteriormente se desarrollen, proceso que es conocido como competencia (Shamsuddin et al. 1993) . En la maduración *in vitro*, el 80% de los ovocitos que se encontraban en la punción folicular en estadio vesicular, reinician el proceso de meiosis llegando al estadio de metafase II y expulsando el primer cuerpo polar entre las 16-24 horas en el medio de maduración (Figura 2). Luego, estos ovocitos son fecundados y comienzan a dividirse las células. Sin embargo, alrededor del 25-40% alcanza el estadio de blastocisto entre los 6-7 días del cultivo (Mucci et al. 2006).

Las diferencias fueron significativas (P ≤0.05) entre los tratamientos (Cuadro 6), siendo el tratamiento ITS el que presentó los mejores resultados superando al control en 8.99%. Estudios realizados por Córdova et al. (2009), reportaron menores tasas de maduración *in vitro* de 78.9% utilizando un medio de maduración TCM suplementado con ITS. Estos resultados difieren en un 11.6% por debajo, a los obtenidos en esta investigación. Esto se puede atribuir a que, en la investigación realizada por Córdova et al. (2009), se usó ITS en menor concentración

y los ovocitos eran procedentes de terneras prepúberes, siendo este el periodo en el cual la hembra crece y se acondiciona para entrar en etapa reproductiva. Por otro lado, Iskandar et al. (2019) alcanzaron altos porcentajes de ovocitos maduros, utilizando ITS a diferentes concentraciones (5 ng/mL, 10 ng/mL y 15 ng/mL), siendo la concentración de 5 ng/mL la que obtuvo el mayor porcentaje, alcanzando el 97.12%. Este alto porcentaje se puede atribuir a que utilizaron un medio TCM suplementado con gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), gonadotropina coriónica humana (hCG), y gentamicina.

Figura 2

A) Ovocitos no madurados; B) Ovocitos madurados a las 24 horas



Cuadro 6

Porcentajes de ovocitos viables y maduros utilizando ITS en el medio de maduración in vitro.

Tratamiento	Ovocitos viables (%)	Ovocitos madurados (%)
ITS	86.89	90.5
Control	89.02	81.51
CV	1.903	7.782
Probabilidad	0.3882	0.0184

Nota. ITS: Insulina-transferrina-selenio; CV: coeficiente de variabilidad. P ≤0.05 difieren estadísticamente entre sí.

Porcentaje de Fertilización *in vitro* (FIV)

Los ovocitos fertilizados, fueron los que el espermatozoide mediante las enzimas líticas logró atravesar la zona pelúcida del ovocito maduro, dando como resultado la formación del

cigoto. Se encontraron diferencias significativas (P ≤0.05) entre los tratamientos (Cuadro 7), siendo el tratamiento ITS el que obtuvo el mayor porcentaje de ovocitos fertilizados, superando al tratamiento control en 9.33% (Figura 3).

Resultados similares fueron encontrados por Jeong YWoo et al. (2008), quienes reportaron tasas de fertilización de 84.4% utilizando un medio definido con 10 mg/L insulina, 5.5 mg/L transferrina y 5g/L selenio en el medio de maduración con ovocitos porcinos. Por otro lado, de acuerdo con Ocaña Quero et al. (1998) quienes utilizaron insulina bovina e insulina humana en el medio de maduración, y obtuvieron porcentajes de fertilización de 60.3% y 57.4% respectivamente, siendo superior al tratamiento sin insulina. Este bajo porcentaje de fertilización posiblemente se presentó porque se utilizaron folículos de un tamaño menor (1 a 5mm), al utilizado en esta investigación.

Cuadro 7

Porcentaje de ovocitos fertilizados, en clivaje y apoptosis, utilizando ITS en el medio de maduración in vitro.

Tratamiento	Ovocitos Fertilizados (%)	Ovocitos	
		Clivaje (%)	Apoptosis al día 3 (%)
ITS	85.8	84.89	15.11
Control	76.47	71.43	28.57
CV	7.552	10.692	22.858
Probabilidad	0.0449	0.0133	

Nota. ITS: Insulina-transferrina-selenio; CV: coeficiente de variabilidad. P ≤0.05 difieren estadísticamente entre sí.

Figura 3

A) Cigotos sin clasificar; B) ovocitos fecundados (Control). Nótese la línea de clivaje

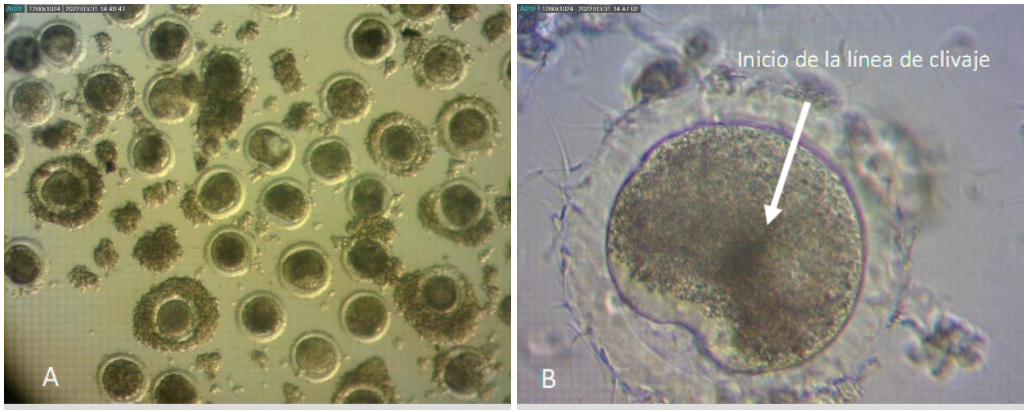
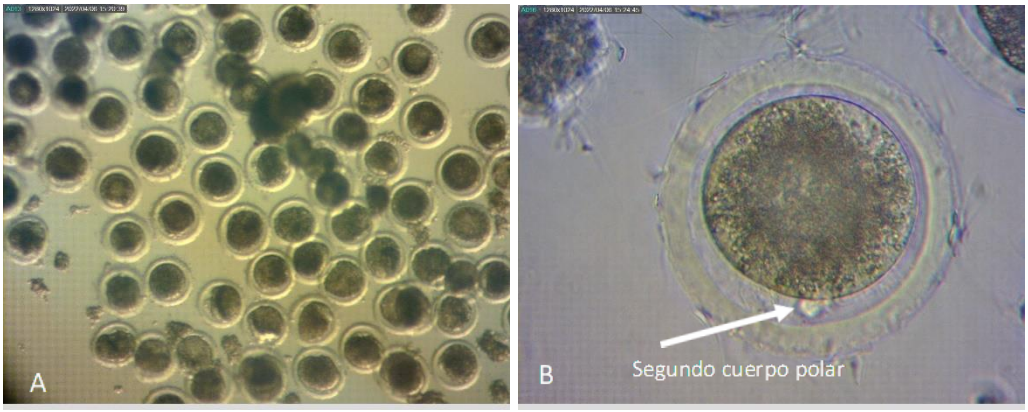


Figura 4

A) Cigotos sin clasificar; B) ovocitos fecundados (ITS). Nótese la presencia del segundo cuerpo polar



Porcentaje de Clivaje y Apoptosis

Se denomina clivaje, cuando el ovocito fecundado (cigoto) sufre una serie de divisiones mitóticas que dan la forma de numerosas células llamadas blastómeros (Figura 5 y 6). La apoptosis se define como un mecanismo fisiológico de muerte programada, que se caracteriza por eventos morfológicos, bioquímicos y requieren de una regulación coordinada de genes específicos (Zamora S et al. 2005).

Las diferencias fueron significativas (P ≤0.05) entre los tratamientos (Cuadro 7), siendo el tratamiento control el que obtuvo menor porcentaje de clivaje, por consiguiente, el tratamiento ITS obtuvo mayor porcentaje, superando en 13.46% al tratamiento control. Resultados similares fueron reportados por Guimarães et al. (2016), quienes reportaron 81.9% de clivaje con la adición de ITS en el medio de maduración. A su vez, estos mismos autores reportaron un porcentaje de clivaje de 85.9% utilizando ITS en el medio de maduración y en el cultivo *in vitro*. Por otro lado, resultados reportados por Quan YShi et al. (2007), con ITS al 1.0% en el medio de maduración, alcanzaron 67.5% de clivaje. Pero, estos mismos autores reportaron similares porcentajes de clivaje de un 82.1%, al utilizar el ITS al 0.5% en el medio de cultivo *in vitro.*

Figura 5

Clivaje control a las 72 horas

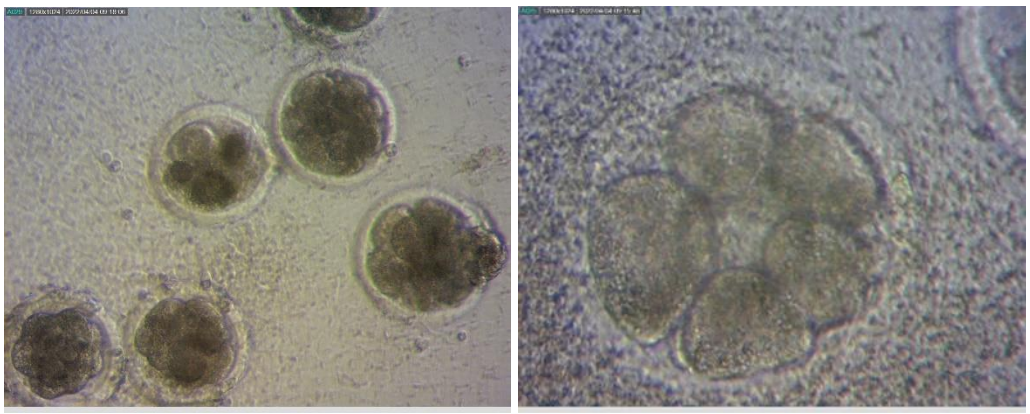
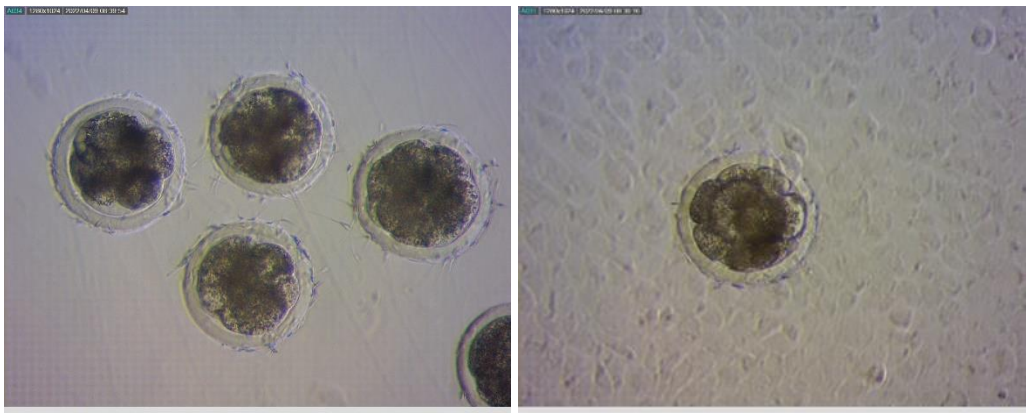


Figura 6

Clivaje ITS a las 72 horas



Porcentaje de Embriones, Mórulas y Blastocistos

Las diferencias fueron significativas (P ≤0.05) en el porcentaje de embriones, mórulas y blastocistos, entre los tratamientos (Cuadro 8), siendo el tratamiento ITS el que tuvo los mejores resultados en porcentajes de embriones, superando en 18.63% al control. En Mórulas el tratamiento control obtuvo mayor porcentaje, superando en 24.36% al tratamiento ITS, por lo tanto, el mayor porcentaje de blastocistos lo obtuvo el tratamiento ITS, con una diferencia de 24.36% entre el tratamiento control. Los resultados de esta investigación para ambos tratamientos superan los rangos establecidos por Mucci et al. (2006) en la cual indica que entre el 80% de los ovocitos fecundados, solo el 25-40% de ellos alcanzan el estadio de blastocisto o blastocisto expandido. Así mismo, los dos tratamientos superan los rangos ideales esperados de 30-40% de producción de embriones, establecidos por Ahuja Aguirre et al. (2009).

Al día 8 se evaluó el porcentaje de embriones en estado de mórulas y blastocistos producidos a partir de la maduración *in vitro* (Figura 7), encontrándose diferencias significativas (P ≤0.05; Cuadro 8). La calidad y el desarrollo del embrión es un aspecto clave y ejercen una gran influencia sobre la tasa de preñez mediante la transferencia de embriones. Según lo mencionado por Looney et al. (2006), la transferencia de una mórula temprana resulta en menores

porcentajes de preñez, que cuando se transfieren embriones con un estadio más avanzado. Además, otro estudio realizado por Hasler (2001), en el cual reportó tasas de preñez estadísticamente significativas (P≤0.05), obteniendo los mejores resultadas cuando se implantaron los embriones de calidad 1, con porcentajes de 73.2%. A partir de esto, bajo las condiciones de este estudio, al utilizar ITS en el medio de cultivo se logra una mejor calidad de embriones por el número de blastocistos, esto se atribuye a lo mencionado por Wydooghe et al. (2014) la suplementación del medio de cultivo *in vitro* (IVC) con ITS demostró que mejora significativamente la producción de blastocistos y calidad de los embriones bovinos.

Cuadro 8

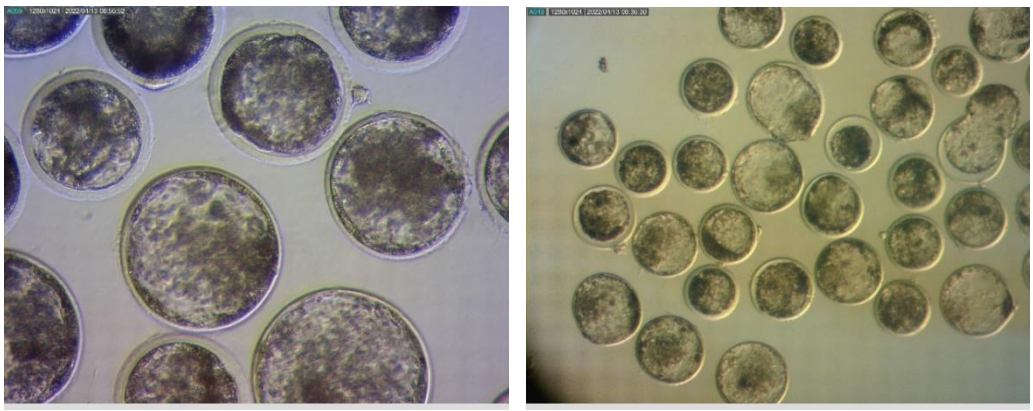
Porcentaje de embriones, mórulas y blastocistos utilizando ITS en el medio de maduración in vitro.

Tratamiento	Embriones (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
ITS	60.17	12.68	87.32
Control	41.54	37.04	62.96
CV	16.689	40.303	19.331
Probabilidad	0.0156	0.0064	

Nota. ITS: Insulina-transferrina-selenio; CV: coeficiente de variabilidad. P ≤0.05 difieren estadísticamente entre sí.

Figura 7

Mórulas y blastocistos a los 8-9 días



Eficiencia General

Las diferencias encontradas fueron significativas (P≤0.05) siendo el tratamiento ITS el que alcanzó los mejores porcentajes, superando al tratamiento control en 21.17%, 21.14%, 21.41% y 18.63% para las relaciones embriones:ovocitos viables, embriones:ovocitos madurados, embriones:ovocitos fecundados y embriones:clivaje respectivamente (Cuadro 9). Según lo mencionado por Kubisch et al. (2001), el parámetro más usado para determinar la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones es la tasa alcanzada de blastocistos. Es por ello por lo que, la eficiencia del medio de cultivo para la producción *in vitro* de embriones bovinos determinará la producción de blastocistos y la competencia para el desarrollo de los embriones (Kuran et al. 2002).

El adicionar insulina en el medio de MIV puede ser una de las causas de un rápido incremento del número de células de la masa celular interna y el progreso en el desarrollo de blastocistos en embriones (Harvey y Kaye 1990). Asimismo, Tatemoto et al. (2004) encontraron que los antioxidantes, como el GSH, transferrina y selenio, mejoraron en gran medida la maduración de los ovocitos a través de la protección mitocondrial, disminuyendo la polispermia y aumentando la formación pronuclear. Estudios realizados por Hu et al. (2011), con el uso de ovocitos recolectados de ovarios de cerdas, agregaron ITS al 1% al medio MIV suplementado con hormonas, en la cual el grupo tratado con ITS en el medio MIV fue significativamente mayor, superando en 24.2% al grupo de ovocitos tratados sin ITS. En otra investigación realizada por Wydooghe et al. (2014), se evaluó el efecto de ITS en el desarrollo y eclosión de ovocitos bovinos en cultivo individual de SOFaa con BSA al 0.4%. Se determinó, cuál de los componentes de ITS es crucial para el desarrollo individual de embriones bovinos, reportando al día 8 porcentajes de blastocistos de 29.1%, superando al tratamiento sin ITS, y se demostró que la ausencia de insulina y transferrina redujo significativamente el desarrollo del blastocisto y, por consiguiente, su eficiencia en la producción de embriones *in vitro.*

En otra investigación realizada por Das et al. (2014), en la cual extrajeron los ovocitos de cerdas prepúberes, los resultados mostraron que el ITS mejoró significativamente la tasa de formación de blastocistos cuando se agregó ITS al 1% en el medio IVC, superando al tratamiento sin ITS en 18.2%, y por lo tanto aumentó su eficiencia por el mayor porcentaje de blastocistos producidos.

Lo anteriormente expuesto, demuestra que el adicionar ITS en el medio de maduración, logra una mayor eficiencia en los procesos de maduración, fertilización, clivaje y producción de embriones. Además, se logró determinar que, la adición de ITS en el medio de maduración aumenta la cantidad de blastocistos y por consiguiente su eficiencia en la producción de embriones.

Cuadro 9

Eficiencia del procedimiento de producción de embriones in vitro, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje, con ITS y control en el medio de maduración.

Tratamiento	Embriones/ ovocitos viables	Embriones/ ovocitos madurados	Embriones/ ovocitos fertilizados	Embriones/ ovocitos en clivaje
ITS	39.66	43.83	51.08	60.17
Control	18.49	22.69	29.67	41.54
CV	29.742	26.319	22.690	16.689
Probabilidad	<0.0001	0.0002	0.0013	0.0156

Nota. ITS: Insulina-transferrina-selenio; CV: coeficiente de variabilidad. P ≤0.05 difieren estadísticamente entre sí.

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, con la adición de ITS en el medio de maduración *in vitro*, se obtuvieron los mejores resultados en porcentajes de maduración, clivaje, embriones y embriones en estadio de blastocisto.

El mayor porcentaje de eficiencia del procedimiento en la producción de embriones *in vitro*, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje, se obtuvo con la adición de ITS en el medio de maduración *in vitro.*

Recomendaciones

Bajo las condiciones de este estudio, se recomienda utilizar ITS en el medio de maduración *in vitro*.

Evaluar el uso de ITS suplementado con hormonas (Factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento insulínico-1, entre otras) en el medio de maduración *in vitro*.

Realizar estudios evaluando distintas concentraciones de ITS en el medio de maduración *in vitro*.

Evaluar y comparar la adición de ITS en el medio de maduración, fertilización y cultivo *in vitro*.

Referencias

Ahuja Aguirre C, Montiel Palacios F, Pérez Hernández P, Gallegos Sánchez J. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos [Investigación Universitaria]. Veracruz, México: Universidad Veracruzana; [consultado el 12 de may. de 2022]. https://acortar.link/W0he85.

[AIDA] Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, editor. 2009. XIII Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza: AIDA. 2 vol. (Producción Animal; vol. 2); [consultado el 8 de oct. de 2021]. https://cutt.ly/RR02CBi.

Augustin R, Pocar P, Wrenzycki C, Niemann H, Fischer B. 2003. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. Reproduction; [consultado el 8 de may. de 2022]. 126(1):91–99. English. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12814351/. doi:10.1530/rep.0.1260091.

Avery B, Strøbech L, Jacobsen T, Bøgh IB, Greve T. 2003. *In vitro* maturation of bovine cumulus–oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. Theriogenology; [consultado el 20 de may. de 2022]. 59(3-4):987–999. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12517399/. doi:10.1016/s0093-691x(02)01139-1.

Barrio M, Peña AI, Quintela LA, Becerra JJ, Herradón PG. 2003. Efectos de la composición y renivación parcial del medio del cultivo sobre el desarrollo de los embriones bovinos producidos *in vitro*. Archivos de Zootecnia; [consultado el 23 de may. de 2022]. 52(200):441–451. https://www.redalyc.org/pdf/495/49520003.pdf.

Bowles CM, Lishman AW. 2009. Attempts to improve the yield of bovine blastocysts by incorporating insulin, selenium and transferrin in the *in vitro* system. SA J. An. Sci; [consultado el 23 de may. de 2022]. 28(1). https://www.ajol.info/index.php/sajas/article/view/44262. doi:10.4314/sajas.v28i1.44262.

Carazas Loayza KE, Ayala Vargas C. mar. 2019. Evaluación de dos medios para la maduración de ovocitos *in vitro* en ganado bovino (Bous taurus) en condiciones de altura. La Paz, Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; [consultado el 5 de may. de 2022]. https://acortar.link/f19DVQ.

Córdova BL, Morató R, Izquierdo MD, Paramio MT, Mogas T. 2009. Efecto de la adición de insulina transferrina-selenio y ácido ascórbico en el medio de maduración in vitro de ovocitos procedentes de terneras prepúberes. En: Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario, editor. XIII Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza: AIDA. p. 699–701 (Producción Animal; vol. 2); [consultado el 8 de oct. de 2021]. https://cutt.ly/RR02CBi.

Crespo Calva JL, Guamán Gutiérrez EG. 2015. Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de genes diffusion [Tesis]. San Antonio de Oriente: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Ciencia y producción agropecuaria; [consultado el 7 de nov. de 2021]. https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4574/1/CPA-2015-027.pdf.

Dalvit GC, Cetica PD, Beconi MT. 1998. Effect of α-tocopherol and ascorbic acid on bovine *in vitro* fertilization. Buenos Aires: University of Buenos Aires; [consultado el 8 de may. de 2022]. https://acortar.link/oewOyV.

Das ZC, Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. 2014. Supplementation of insulin-transferrin-selenium to embryo culture medium improves the *in vitro* development of pig embryos. Zygote; [consultado el 12 de may. de 2022]. 22(3):411–418. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23506698/. doi:10.1017/S0967199412000731.

Fernández A, Diaz T, Muñoz G. 2007. Producción in vitro de embriones bovinos. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias; [consultado el 6 de nov. de 2021]. 48(1):51–60.

Fouladi-Nashta AA, Campbell KHS. 2006. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. Reproduction; [consultado el 22 de may. de 2022]. 131(3):449–460. eng. https://acortar.link/JTzbhJ. doi:10.1530/rep.1.00581.

García-Díaz JR, Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz Blanco S, Ruiz López S. 2013. Adición de sustancias antioxidantes en los medios de cultivo empleados en la producción *in vitro* de embriones en mamíferos. Revista Salud Animal; [consultado el 20 de oct. de 2021]. 35(1). https://acortar.link/yTcerT.

Guimarães ALS, Pereira SA, Diógenes MN, Dode MAN. 2016. Effect of insulin-transferrin-selenium (ITS) and l-ascorbic acid (AA) during *in vitro* maturation on *in vitro* bovine embryo development. Zygote; [consultado el 9 de may. de 2022]. 24(6):890–899. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27748220/. doi:10.1017/S0967199416000228.

Harvey MB, Kaye PL. 1990. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts *in vitro*. Development; [consultado el 10 de may. de 2022]. 110(3):963–967. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2088732/. doi:10.1242/dev.110.3.963.

Hasler JF. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. Theriogenology; [consultado el 12 de may. de 2022]. 56(9):1401–1415. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11768807/. doi:10.1016/s0093-691x(01)00643-4.

Hu J, Ma X, Bao JC, Li W, de Cheng, Gao Z, Lei A, Yang C, Wang H. 2011. Insulin-transferrin-selenium (ITS) improves maturation of porcine oocytes *in vitro*. Zygote; [consultado el 8 de may. de 2022]. 19(3):191–197. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21303586/. doi:10.1017/S0967199410000663.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology; [consultado el 19 de may. de 2022]. 47(1):23–32. https://acortar.link/yoQmHQ. doi:10.1016/S0093-691X(96)00336-6.

[IETS] International Embryo Transfer Society. 2015. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Estados Unidos: IETS. 16 p; [consultado el 8 de may. de 2022]. https://acortar.link/P6vPlC.

Iskandar H, Sonjaya H, Yusuf M. 2019. Effect of Adding Insulin Transferrin Selenium (ITS) in the medium on maturation and fertilization rates of bali cattle oocytes. JITV; [consultado el 9 de may. de 2022]. 24(3):95. https://acortar.link/wVmOqT. doi:10.14334/jitv.v24i3.2020.

Jeong YW, Hossein MS, Bhandari DP, Kim YW, Kim JH, Park SW, Lee E, Park SM, Jeong YI, Lee JY, et al. 2008. Effects of insulin-transferrin-selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. Animal Reproduction Science; [consultado el 11 de may. de 2022]. 106(1-2):13–24. eng. https://acortar.link/eZ3rri. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.03.021.

Kang J-T, Atikuzzaman M, Kwon D-K, Park S-J, Kim S-J, Moon J-H, Koo O-J, Jang G, Lee B-C. 2012. Developmental competence of porcine oocytes after *in vitro* maturation and *in vitro* culture under different oxygen concentrations. Zygote; [consultado el 20 de may. de 2022]. 20(1):1–8. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21791162/. doi:10.1017/S0967199411000426.

Kim S, Lee GS, Lee SH, Kim HS, Jeong YW, Kim JH, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. 2005. Embryotropic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor on development of porcine preimplantation embryos produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. Molecular reproduction and development; [consultado el 8 de may. de 2022]. 72(1):88–97. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15952216/. doi:10.1002/mrd.20327.

Kubisch HM, Larson MA, Ealy AD, Murphy CN, Roberts RM. 2001. Genetic and environmental determinants of interferon-τ secretion by *in vivo*- and *in vitro*-derived bovine blastocysts. Animal Reproduction Science; [consultado el 8 de may. de 2022]. 66(1-2):1–13. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11343838/. doi:10.1016/s0378-4320(01)00086-0.

Kuran M, Robinson JJ, Brown DS, McEvoy TG. 2002. Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryos after *in vitro* production in contrasting culture systems. Reproduction; [consultado el 11 de may. de 2022]. 124(1):155–165. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12090928/.

Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW. 2006. Improving fertility in beef cow recipients. Theriogenology; [consultado el 6 de may. de 2022]. 65(1):201–209. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16289261/. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.023.

Merton JS, Roos APW de, Mullaart E, Ruigh L de, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology; [consultado el 1 de may. de 2022]. 59(2):651–674. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12499010/. doi:10.1016/s0093-691x(02)01246-3.

Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Albeiro RH. 2006. Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Archivos de medicina veterinaria; [consultado el 9 de oct. de 2021]. 38(2):97–104. https://acortar.link/0k2k3Z.

Ocaña Quero JM, Pinedo Merlín M, Ortega Mariscal M, Moreno Millán M. 1998. Influence of human and bovine insulin on *in vitro* maturation, fertilization and cleavage rates of bovine oocytes. [sin lugar]: Universidad de Córdoba, España; [consultado el 3 de may. de 2022]. https://core.ac.uk/download/pdf/60864632.pdf.

Palma GA. 2001. Biotecnología de la reproducción. Primera. Argentina: [sin editorial]. ISBN: 987-43-3779-6; [consultado el 6 de may. de 2022].

Quan YS, Naruse K, Kim BC, Kim HR, Xun Han R, Min Choi S, Sik Park C, Jin DI. 2007. Effects of insulin transferrin and selenium (ITS) on *in vitro* development of porcine parthenogenetic

and nuclear transfer embryos. Korea: Chungnam National University; [consultado el 4 de may. de 2022]. https://acortar.link/4L1Zxv.

Quispe CE, Ancco G. E, Solano A. J, Unchupaico P. I, Mellisho S. E. 2018. Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. Rev. investig. vet. Perú; [consultado el 30 de abr. de 2022]. 29(4):1114–1121. https://acortar.link/LlX7Mk. doi:10.15381/rivep.v29i4.14418.

Reader KL, Stanton J-AL, Juengel JL. 2017. The role of oocyte organelles in determining developmental competence. Biology (Basel); [consultado el 20 de may. de 2022]. 6(3). eng. https://acortar.link/Q6v07w. doi:10.3390/biology6030035.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Molecular reproduction and development; [consultado el 6 de may. de 2022]. 61:234–248. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11803560/.

Scott CA, Robertson L, Moura RT de, Paterson C, Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. Vet Rec; [consultado el 30 de abr. de 2022]. 134(17):440–443. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8048215/. doi:10.1136/vr.134.17.440.

Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. 1993. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. Animal Reproduction Science; [consultado el 2 de may. de 2022]. 31(1-2):49–60. https://acortar.link/7U1Qbj. doi:10.1016/0378-4320(93)90026-N.

Sirard M-A, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. Theriogenology; [consultado el 21 de may. de 2022]. 65(1):126–136. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16256189/. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.020.

Tatemoto H, Muto N, Sunagawa I, Shinjo A, Nakada T. 2004. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. Biology of Reproduction; [consultado el 8 de may. de 2022]. 71(4):1150–1157. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15175235/. doi:10.1095/biolreprod.104.029264.

Vélez IC, Chica A, Urrego R, Torres V, Jimenez-Escobar C, Zambrano-Varón. 2017. Producción *in vitro* de embriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos Bos inidicus. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 12(2). https://acortar.link/rHt6tJ.

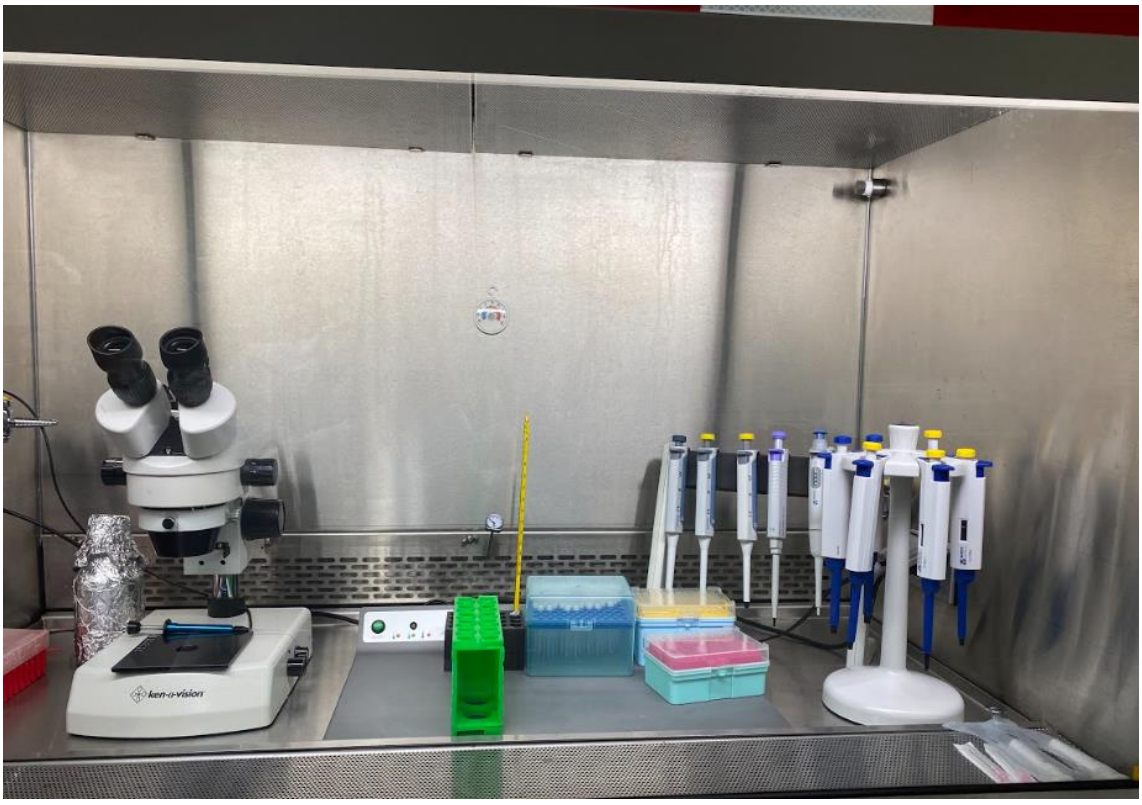
Wydooghe E, Heras S, Dewulf J, Piepers S, van den Abbeel E, Sutter P de, Vandaele L, van Soom A. 2014. Replacing serum in culture medium with albumin and insulin, transferrin and selenium is the key to successful bovine embryo development in individual culture. Reproduction, Fertility and Development; [consultado el 8 de may. de 2022]. 26(5):717–724. eng. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23711172/. doi:10.1071/RD13043.

Zamora S JD, Otárola A IC, Brenes G O. 2005. La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. Rev. chil. nutr; [consultado el 11 de may. de 2022]. 32(3). https://acortar.link/ZEW78G. doi:10.4067/S0717-75182005000300002.

Anexos

Anexo A

Instrumentos dentro de la cámara de flujo laminar



Anexo B

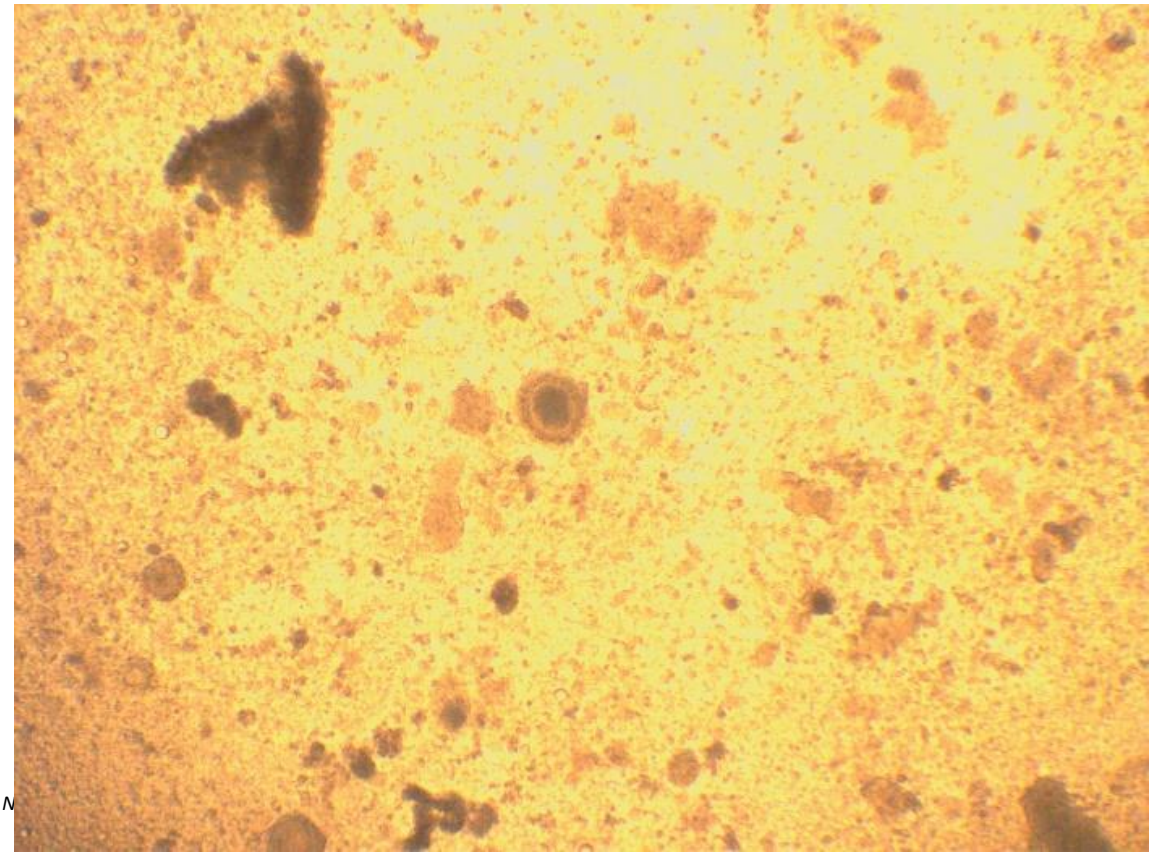
Preparación de los ovarios

Anexo C

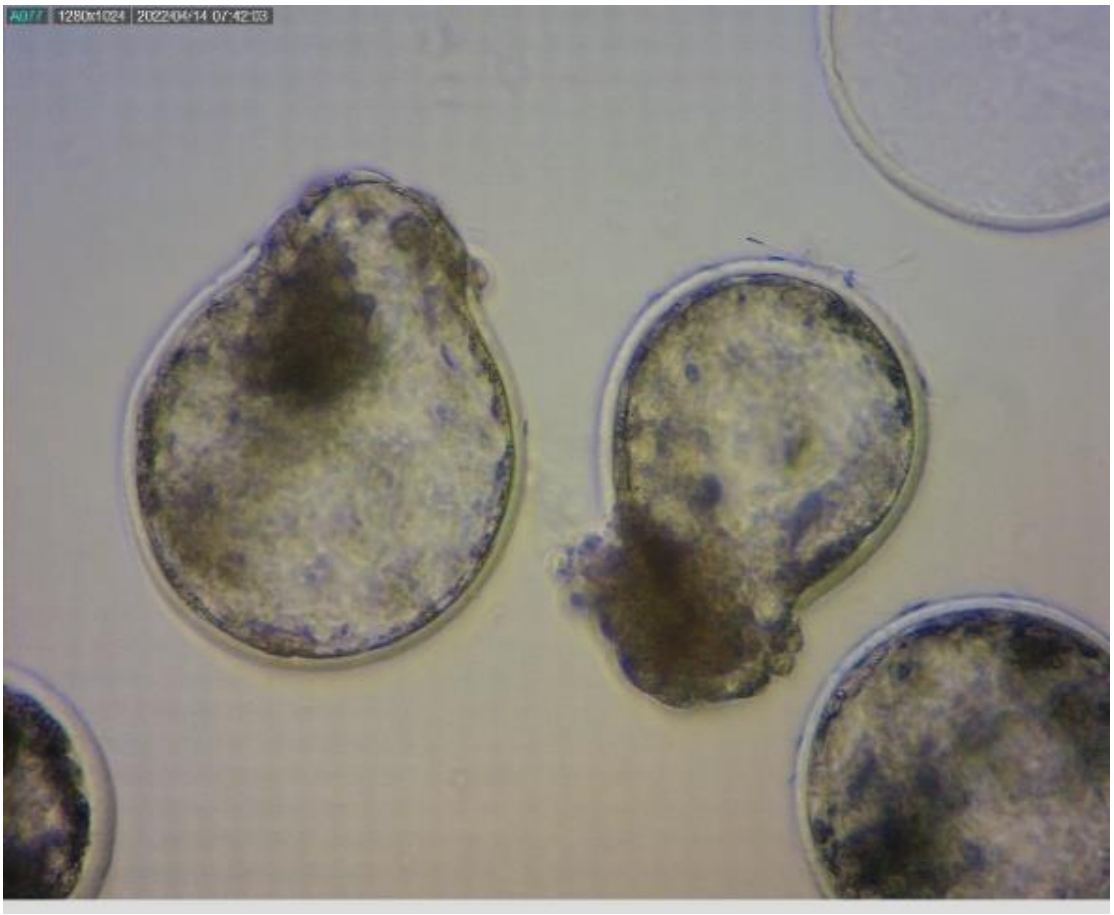
Aspiración folicular

Anexo D

Placa de búsqueda de ovocitos viables



N

Anexo E

Embriones protruidos