

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



Proyecto Especial de Graduación
**Efecto de la suplementación con Cisteamina en el medio de
maduración sobre la producción de embriones bovinos *in vitro***

Estudiante
Krista Susseth Zapata Barrientos

Asesores
John Jairo Hincapié, D.Sc.
Rogel Castillo, M.Sc.

Honduras, julio 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA ODILA TREJO

Directora Departamento de Ciencia y Produccion Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis asesores, D.Sc John Jairo Hincapié por haberme brindado la oportunidad de realizar mi investigación en el laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano, quien con su conocimiento y apoyo me guió en cada una de las etapas de este proyecto y brindó las herramientas que fueron necesarias para el proceso de investigación.

Así mismo al M.Sc. Rogel Castillo por toda la ayuda brindada durante este trabajo, por su confianza y disposición para consultas y orientación profesional necesarias para culminar exitosamente mi proyecto especial de graduación.

Contenido

Agradecimientos	3
Contenido.....	4
Índice de Cuadros.....	6
Índice de Figuras	7
Índice de Anexos	8
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Materiales y Métodos	15
Colecta de Ovarios	15
Aspiración de los Ovocitos y Maduración <i>in Vitro</i>	15
Fertilización <i>in Vitro</i> (FIV).....	17
Cultivo <i>in Vitro</i>	19
Tratamientos.....	20
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	22
Resultados y Discusión.....	23
Porcentaje de Maduración <i>in Vitro</i> (MIV).....	23
Porcentaje de Ovocitos en Metafase II (MII)	24
Porcentaje de Fertilización	26

Porcentaje de Clivaje	27
Porcentaje de Apoptosis	28
Porcentaje de Mórulas y Blastocistos	31
Porcentaje de Embriones	32
Eficiencia General de la PIV	33
Conclusiones	35
Recomendaciones	36
Referencias	37
Anexos	41

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Preparación del medio 10X SP-TL para el Percoll 90% utilizado en Fertilización in vitro en bovinos.....	17
Cuadro 2 Valores porcentuales de ovocitos madurados in vitro y en Metafase II (MII) para los tratamientos	25
Cuadro 3 Valores Porcentuales de Ovocitos Fertilizados en Clivaje y Apoptosis al Día Tres para los Trtamientos con Cisteamina y Control	30
Cuadro 4 Valores porcentuales de embriones y su categoría para los tratamientos con cisteamina y control.....	33
Cuadro 5 Eficiencia del procedimiento de PIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y en clivaje	33

Índice de Figuras

Figura 1 Ovocitos madurados 24 horas con cisteamina.	25
Figura 2 Ovocitos madurados 24 horas con tratamiento control.....	26
Figura 3 Ovocitos en estadio de Metafase II (MII). Las flechas blancas señalan el núcleo (N) y las rojas el primer cuerpo polar (CP).....	26
Figura 4 Clivaje de ovocitos en tratamiento con cisteamina. Izquierda: muestra un grupo de ovocitos en proceso de división celular. Derecha: ovocito superior en proceso de división celular, nótese la línea divisoria; ovocito inferior fertilizado, nótese la presencia del segundo cuerpo polar .	30
Figura 5 Clivaje de ovocitos en el tratamiento control.....	31
Figura 6 Izquierda: blastocisto en el tratamiento control al día 7; Derecha: blastocisto expandido en el tratamiento con cisteamina al día 7.	34

Índice de Anexos

Anexo A Acondicionamiento de Ovarios.....	41
Anexo B Preparacion de Medios de Colección y Maduración	42
Anexo C Aspiración folicular	43
Anexo D Medio para acondicionamiento y capacitación de semen	44
Anexo E Ovocitos madurados transferidos a placas Nunc TM de fertilización	45
Anexo F Descongelación del semen.....	46
Anexo G Composición de solución transporte.....	47

Resumen

En los laboratorios de fertilización *in vitro* (FIV) se realizan diferentes suplementos en los medios de maduración con el propósito de obtener un mejor desarrollo embrionario, así mismo incrementar la tasa de formación de blastocistos para obtener una mayor tasa de óvulos fecundados en la fertilización *in vitro*, dentro de estos suplementos se encuentran la cisteamina, L-Glutamina, entre otros. Los objetivos de este estudio fueron evaluar los porcentajes de maduración, fertilización y clivaje con la suplementación de cisteamina en el medio de maduración *in vitro* y evaluar la eficiencia del proceso de FIV con la suplementación de cisteamina en el medio de maduración. Se desarrollaron dos tratamientos: MMO suplementado con 100 μ M de Cisteamina y MMO control sin suplementar. Para el primer tratamiento se utilizaron 261 ovocitos y para el segundo tratamiento 230 ovocitos. Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre ambos tratamientos para la maduración, fertilización y producción de embriones *in vitro* con valores de 86.52% y 77.78%, 77.89% y 66.50% y 61.54% y 46.84% respectivamente. El mayor porcentaje de ovocitos en metafase II fue de 85.19% para el tratamiento cisteamina mientras que el control presentó 69.57%. La mejor eficiencia en todo el proceso de producción *in vitro* de embriones se obtuvo con la suplementación de cisteamina. Se concluye que la suplementación con cisteamina en el medio de maduración mejora todos los parámetros en el proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos.

Palabras clave: Apoptosis, blastocisto, desarrollo embrionario, fertilización, ovocito.

Abstract

Laboratories of *in vitro* fertilization (IVF) make different supplements, these are added to the maturation media with the purpose of obtaining a better embryo development, as well as increasing the rate of blastocyst formation to obtain a higher rate of fertilized eggs in *in vitro* fertilization, among these supplements are cysteamine, L -glutamine, among others. The objectives of this study were to evaluate the percentages of maturation, fertilization and cleavage with cysteamine supplementation in the *in vitro* maturation medium and to evaluate the efficiency of the IVF process with cysteamine supplementation in the maturation medium. Two treatments were developed: MMO supplemented with 100 μ M Cysteamine and control MMO unsupplemented . For the first treatment 261 oocytes were used and for the second treatment 230 oocytes were used. There were differences ($P \leq 0.05$) between both treatments for maturation, fertilization and *in vitro* embryo production with values of 86.52% and 77.78%, 77.89% and 66.50% and 61.54% and 46.84% respectively. The highest percentage of oocytes in metaphase II was 85.19% for the cysteamine treatment while the control presented 69.57%. The best efficiency in the whole IVF process was obtained with cysteamine supplementation. It is concluded that cysteamine supplementation in the maturation medium improves all parameters in the bovine IVF process.

Keywords: Apoptosis, blastocysts, embryonic development, fertilization, oocyte.

Introducción

La fertilización *in vitro* es una técnica de la biotecnología reproductiva, la cual consiste en la fecundación de ovocitos provenientes de ovarios por medio de una aspiración folicular, con su respectivo espermatozoide originario del esperma de un toro donador, bajo condiciones controladas de laboratorio, usando un procedimiento estandarizado para cada especie animal; no obstante, para lograr buenos resultados es necesario cerciorarse que se cumplan con todas las normativas que se encuentran en dicho procedimiento, logrando así una fecundación exitosa. Las primeras investigaciones se hicieron en especies de invertebrados marinos. La razón de esto, es que la fecundación ocurre afuera de la hembra, al contrario de los mamíferos en los que ocurre dentro del organismo (Filipiak y Larocca 2010). Luego Brackett et al. (1982) generarían el primer ternero producido bajo fertilización *in vitro*. Sin embargo, los primeros terneros nacidos de ovocitos madurados *in vitro*, fecundados *in vitro* y cultivados (desarrollo temprano) *in vitro* se reportó en 1987 (Filipiak y Larocca 2010).

La fertilización *in vitro* (FIV) es una técnica que por sus grandes beneficios se ha logrado establecer como una biotecnología muy utilizada por un sin número de laboratorios de reproducción bovina dispersos alrededor del mundo. Esta metodología llevada a cabo en el laboratorio, donde el ovocito maduro se expone a espermatozoides capacitados para que se produzca la fecundación proporcionando las condiciones óptimas que simulen lo que ocurre de forma natural (García J. y Martínez J. 2013). En la FIV bovina se utiliza semen de alta calidad que ha sido previamente congelado, lo que implica someter a los espermatozoides a un procedimiento de lavado y selección en el cual, los de mejor movilidad son separados del plasma seminal, de los muertos e inmóviles, de los diluyentes y crioprotectores y de otras estructuras por medio de técnicas como el Swim up y el gradiente de Percoll (Urrego et al. 2008).

Entre sus beneficios cabe destacar que es una técnica muy útil destinada para el mejoramiento genético de las diversas razas bovinas. Asimismo, aumenta el rendimiento de los

programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético García J. y Martínez J. (2013) Además, permite producir *in vitro* embriones de sexo conocido utilizando semen sexado haciendo posible una racionalización de la explotación de hatos (Crespo y Guamán 2015).

La FIV en bovinos, se desarrolla en tres etapas fundamentales: maduración de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros y cultivo de embriones, donde la maduración de ovocitos conlleva una de las partes más importantes ya que es aquí donde se capacita el óvulo para que posteriormente sea apto para una fecundación, cabe señalar que de esta etapa dependerá que se logre un buen cultivo de embriones y una excelente producción de embriones de calidad (Hincapié 2019).

Es necesario transformar los medios de cultivo indefinidos, muy complejos y suplementados frecuentemente con suero, en medios más definidos, en los cuales cada uno de sus componentes pudiera ser estudiado en función del efecto que genera sobre el desarrollo embrionario, su sobrevivencia postcriopreservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables (Mucci et al. 2006).

Los medios de maduración convencionales como el TCM-199 tienen una serie de componentes tanto orgánicos como inorgánicos que logran que los ovocitos aspirados alcancen su madurez, además, con el fin de obtener el mayor número de ovocitos madurados se le agregan una serie de compuestos al medio de maduración como lo es la cisteamina. La cisteamina es un compuesto denominado tiol, es un compuesto orgánico que contiene el grupo funcional formado por un átomo de azufre y uno de hidrógeno. Comúnmente los grupos tioles son llamados mercaptanos, promotora de la síntesis del Glutatión (GSH); se ha demostrado que su uso aumenta el contenido y síntesis de Glutatión (GSH) intracelular mediante la captación de cisteína y mejora el desarrollo de los embriones en las especies bovina, porcina y ovina, al ser suplementado en el medio de maduración (Luciano et al. 2004). La cisteamina promueve la síntesis de GSH por el mecanismo de centrar su poder reductor de la cistina a cisteína, la biosíntesis de GSH depende de la disponibilidad de cisteína (Bernal 2016).

Se comprobó que la adición de compuestos de tiol como la cisteamina al medio de maduración aumenta la eficiencia de la producción de blastocitos *in vitro* a partir de ovocitos

inmaduros de bovino. Los niveles más altos de GSH en los ovocitos madurados en presencia de cisteamina sugieren que los efectos beneficiosos de la cisteamina en la maduración *in vitro* y el desarrollo posterior después de la fertilización *in vitro* están mediados por GSH, el cual es una pieza clave en mejores rendimientos de la producción embrionaria en la fertilización *in vitro* (DeMatos et al. 1995). Los medios de cultivo han ido mejorando con el fin de proveer condiciones cada vez más parecidas a las del oviducto y ambiente uterino, con el propósito de favorecer la segmentación, formación del blastocelo y el desarrollo normal del embrión (Ortega et al. 2022).

El glutatión es un tipo de tripéptido tiol que se puede encontrar en un gran número de células, su función está enfocada en el metabolismo, protección celular y su transporte. Participa en la reducción de los disulfuros y otras moléculas, también tiene la capacidad de conjugarse con compuestos de origen exógeno y endógeno. Entre sus otros beneficios se puede encontrar que el glutatión brinda protección a las células contra los grupos reactivos de oxígeno y los radicales libres que causan efectos destructivos hacia las células. Es posible realizar modificaciones del metabolismo del glutatión mediante la administración de compuestos que aumentan la síntesis de glutatión como lo es la suplementación con cisteamina en el caso de la investigación presente (Meister 1983). Uno de los papeles más importantes del GSH es mantener el estado redox, actuando como tampones metabólicos pudiendo atenuar el estrés oxidativo, mediante la eliminación de agentes oxidantes en la célula protegiéndola de los efectos causados por el daño oxidativo (Hernández A y Hernández H 2010). El sistema formado por el glutatión y las enzimas que intervienen en el ciclo redox del glutatión forman el principal sistema de defensa a nivel intracelular frente a las agresiones oxidativas (Bernal 2016).

En estudios anteriores se ha evidenciado que el uso de la cisteamina puede aglomerar una serie de resultados que ayudan en gran medida a aumentar la eficiencia, además incrementa las concentraciones GSH intracelular de ovocitos que progresan de vesícula germinal al estado de Metafase II (Ali et al. 2003). La suplementación del medio de maduración con cisteamina se realiza

con el fin de obtener un mejor desarrollo embrionario, disminuir el peróxido de hidrógeno intracelular e incrementar sustancialmente la tasa de formación de blastocitos, lo cual da como resultado una mayor tasa de óvulos fecundados en la fertilización *in vitro* en bovinos. Los objetivos de la presente investigación fueron: Evaluar los porcentajes de maduración, fertilización y clivaje con la suplementación de cisteamina en el medio de maduración *in vitro*; Evaluar el porcentaje de ovocitos en etapa de Metafase II; Evaluar el porcentaje de embriones al día ocho de cultivo *in vitro*; Evaluar la eficiencia del proceso de PIV con la suplementación de cisteamina en el medio de maduración.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó entre noviembre de 2020 y julio 2021 en las instalaciones del laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano, localizado a 32 km de Tegucigalpa, con una temperatura promedio de 24 °C, 800 msnm y una precipitación promedio anual de 1100 mm.

Los ovocitos fueron aspirados de ovarios de vacas cosechadas en la planta de cárnicos de la empresa EMPASA (Empresa Agropecuaria S.A.) ubicada en el Valle del Yegüare a 5 km de la EAP Zamorano.

Colecta de Ovarios

Los ovarios fueron colectados al momento de faenadas las hembras y colocados en solución de transporte (solución salina fisiológica 0.9% + estreptomicina 0.5 g/litro + penicilina G 100,000 UI/litro) atemperada a 35 °C dos horas antes de ir a la plata de faenado. Una vez recolectados los ovarios, fueron llevados al laboratorio (en un tiempo no mayor a dos horas) en donde se procedió a realizar el acondicionamiento (retirar el tejido sobrante, grasa) y se lavaron en solución de transporte atemperada a 35 °C tres veces, a fin de retirar los restos de sangre (Anexo 1).

Aspiración de los Ovocitos y Maduración *in Vitro*

Se preparó el medio de colección de ovocitos (MCO) (Anexo 2), para lo cual se utilizó 10 mL de la solución stock de Minitube MCO 19990/0050® + 60 mg de suero albúmina bovino EFAF. Esta solución se preparó y atemperó a 38 °C durante cuatro horas antes de realizar la maniobra.

Simultáneamente y cuatro horas antes de la maniobra de aspiración, se prepararon las placas de maduración (Anexo B), para lo cual se tomaron 9 mL de la solución stock de Minitube MMO 19990/0010® + 1 mL de suero de vaca en celo, se esterilizó por filtración a 0.22 µm y agregó 100 µl de FSH stock + 50 µl de LH stock. Se dividió este volumen en dos tubos 5 mL, de tal manera que un tubo fue para el tratamiento control y el otro tubo para el tratamiento suplementado con cisteamina. Se procedió a elaborar en una placa Petri de 35 mm las microgotas flotantes de 100 µl (ancladas con 10 µl), se cubrió con aceite mineral y en otra placa Petri de 35 mm se realizó el mismo procedimiento,

pero con el MMO suplementado con 100 μ M de cisteamina, luego se colocaron ambas placas a equilibrar en la incubadora a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad relativa a saturación. Se depositaron 10 ovocitos por gota, conservando la proporción de 1 ovocito/10 μ l de medio.

De igual manera dos horas antes de ir a la planta de faendado, se esterilizaron con alcohol clínico al 70% todas las superficies de la cámara de flujo laminar, platina térmica de trabajo, estereoscopio, pipeta Drummond. Posteriormente se dejaron atemperando, ya que todas las superficies que entraron en contacto con los ovocitos debían encontrarse a 38 °C.

Para la aspiración propiamente dicha, se colocaron 3 mL de MCO en un tubo de policarbonato estéril de 50 mL y éste se colocó en una gradilla dentro del baño María a 38 °C; se utilizaron jeringas de dos piezas y agujas calibre 18 x 1 ½ pulgadas estériles. Se preparó una placa Grid para la búsqueda y una placa Petri en X (cuatro compartimentos) colocando en tres de ellos 1 mL de MCO y en el cuarto pozo 1 mL de MMO, que sirvieron para el lavado de los ovocitos.

Una vez acondicionados los ovarios, se procedió a la aspiración (Anexo 3) de todos los folículos que tuvieron un tamaño entre 2 y 10 mm de diámetro; a medida que el fluido fue aspirado, igualmente fue depositado en el tubo de 50 mL que se encontraba en el baño María; al terminar el proceso de aspiración, se dejaron decantar los ovocitos por 15 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante con una pipeta de 1000 μ l lentamente, teniendo cuidado de no crear turbulencia para evitar perder ovocitos, y dejando alrededor de 5 mL de volumen en el fondo. Este precipitado fue vertido en la placa Grid de búsqueda, lavando tres veces el tubo con MCO.

A medida que se realizó la búsqueda, se desarrolló la clasificación igualmente, de tal manera de solo seleccionar los ovocitos categoría 1 y 2 (con tres o más líneas de células del *cumulus oophorus*, citoplasma homogéneo y la zona pelúcida completamente intacta). Los ovocitos se depositaron en uno de los pozos de la placa X que contenía MCO y luego fueron lavados dos veces en los demás pozos igualmente con MCO, al final en el último pozo se tuvo una gota de 1000 μ l de MMO y luego fueron colocados en las placas Petri de 35 mm que se encontraban equilibrando, colocando 230 ovocitos en

las placas con MMO + cisteamina Sigma Aldrich y 261 en las placas con MMO (control), depositando 10 ovocitos/microgota flotante y llevados a la incubadora por 24 horas a 38.5 °C, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) para desarrollar el proceso de Maduración in vitro (MIV). Las 24 horas se contaron a partir del momento en que se aspiró el primer folículo. Se conservó la proporción de 1 ovocito/10 µl de medio.

Fertilización *in Vitro* (FIV)

El medio para acondicionamiento y capacitación del semen (Anexo 4) fue el Minitube medio de capacitación 19990/0020®, del cual se tomaron 20 mL (como solución stock) + suero albúmina bovino fracción V 120 mg + piruvato de sodio (solución stock) 1000µl + gentamicina 200 µl, luego se procedió a esterilizar por filtración a 0.22 µm. De este volumen se tomaron 10 mL en un tubo de 15 mL de policarbonato y se colocaron dos horas antes de realizar la maniobra en la incubadora a 38.5 °C, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (> 90%). Con los otros 10 mL se preparó el gradiente de Percoll 45-90%. La preparación del medio 10X SP-TL para preparar el Percoll 90% se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Preparación del medio 10X SP-TL para el Percoll 90% utilizado en Fertilización in vitro en bovinos.

Componente	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. HEPES= N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

Se ajustó el pH a 7.3, se esterilizó por filtración en 0.22 µm; se almacenó en alícuotas de 4 mL indefinidamente a 4 °C.

Una vez preparada la solución 10X SP-TL se procedió a preparar el Percoll 90%, colocando 4 mL de 10X SP-TL en un beaker de 50 mL + 0.084 g de bicarbonato de sodio + 90 µl de Lactato de Sodio; se agitó suavemente hasta que el bicarbonato se disolvió completamente. Luego se agregó 36 mL

Percoll + 158 μ l de $MgCl_2$ + 78 μ l de $CaCl_2$, se mezcló suavemente y se ajustó pH a 7.3-7.45, se esterilizó por filtración en 0.45 μ m.

Una vez preparado el Percoll 90%, se colocó 3 mL en un tubo de 15 mL, y se llevó a equilibrar dos horas antes a la incubadora; se tomó 1.5 mL de la solución 10X-SP-TL y se mezclaron con 1.5 mL de Percoll 90% así se obtuvo la solución de 3 mL de Percoll 45% e igualmente se llevaron a equilibrar a la incubadora durante dos horas. Todos los tubos que se llevaron a equilibrar en la incubadora se colocaron con la tapa floja a fin de facilitar el proceso de gasificación.

Se preparó 10 mL del Medio de Fertilización Minitube 19990/0030® + Suero Albúmina Bovino EFAF 60 mg + piruvato de sodio 100 μ l + heparina 200 μ l, se esterilizó por filtración a 0.22 μ m. Con este medio se prepararon las placas Nunc™ de fertilización (una placa por tratamiento) se colocaron en cada pozo 600 μ l de medio (no cubrir con aceite) el cual sirvió para colocar 40 ovocitos madurados/pozo, y fueron llevadas a la incubadora mínimo tres horas antes de realizar la maniobra de fertilización. De igual manera se preparó una placa Petri de 35mm con 2 mL de medio de fertilización y se colocó en la incubadora, esta sirvió para el lavado de los ovocitos madurados.

Alrededor de una hora antes de iniciar la maniobra de fertilización, se sacaron las soluciones de Percoll 45% y 90%, para preparar el gradiente en un tubo de 15 mL de policarbonato así: se depositaron lentamente en el fondo del tubo del Percoll 45% los 3 mL del Percoll al 90%. De tal forma que se observó un menisco entre los dos gradientes: debe quedar el Percoll al 90% en el fondo y el 45% sobre este (este proceso se denomina sotoposición), luego colocarlo nuevamente en la incubadora hasta realizar la maniobra.

Se retiraron de la incubadora las placas Petri de 35 mm con los ovocitos madurados de cada tratamiento, se transfirieron lo más pronto posible a la placa Petri de 35 mm que contiene 2 mL de medio de fertilización, se realizaron dos lavados y luego se pasaron a la placa Nunc de fertilización de cada tratamiento (Anexo 5), que se tenía equilibrando en la incubadora en proporción de 30

ovocitos/pozo de 600 µl de medio de fertilización y fueron llevadas nuevamente a la incubadora a 5% CO₂, 38.5 °C y humedad relativa a saturación.

Se procedió a descongelar en agua a 35 °C durante 45 segundos, dos pajuelas de semen del mismo toro, se secaron las pajuelas en papel toalla, se armó la pistola de inseminación y se depositó el semen suavemente encima del gradiente de Percoll 45% (Anexo 6). Posteriormente se tomó en cuenta desinfectar el día anterior la pistola y las tijeras con alcohol clínico al 70%. Se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 800 g/10 minutos, posteriormente se retiró suavemente el pellet formado en el fondo, con una pipeta de 1000 µl y fue depositado en el tubo de policarbonato que contenía 10 mL de medio de acondicionamiento y capacitación y que se encontraba en la incubadora, se procedió a centrifugar nuevamente a 200 g/10 minutos, al cabo de este tiempo se retiró el sobrenadante dejando lo mínimo en el fondo con el pellet. Se procedió a calcular la concentración en la cámara de Neubauer, para ello se tomó 5 µl de semen y fueron mezclados con 95 µl de agua la cual debía estar previamente preparada en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se cargó la cámara con una gota de 10 µl de la dilución 95:5, se miró al microscopio con objetivo de 40x y se contó la cantidad de espermatozoides en cinco cuadros de doble borde. Para efectos prácticos se tomó 600 µl que corresponden al volumen de cada pozo de la placa Nunc™ de fecundación, y se dividió por el número de espermatozoides contados, el resultado obtenido significa el volumen en µl que se tomó del tubo que contiene los espermatozoides a fin de fertilizar con 1×10^6 espermatozoides/mL. Se recomienda previo a realizar la fertilización evaluar en semen en el microscopio de contraste de fase a fin de garantizar una motilidad individual mínimo 80%. Una vez depositados los espermatozoides en cada pozo de las placas de fecundación que contienen los ovocitos maduros de cada tratamiento, se dejó en la incubadora a 5% CO₂, 38.5 °C y humedad relativa a saturación durante 18 horas.

Cultivo *in Vitro*

Previo a realizar esta maniobra, cuatro horas antes, se preparó dos placas Nunc™ de cultivo (una para cada tratamiento), para lo cual se utilizó el medio de cultivo SOF Minitube 19990/0041®

(SOF solución stock 10 mL + suero de vaca en celo 1 mL + aminoácidos esenciales 400 µl + aminoácidos no esenciales 100 µl + gentamicina 60 µl), se esterilizó por filtración a 0.22 µm; se prepararon las placas Nunc™ de cultivo realizando microgotas flotantes de 100 µl cubiertas con aceite mineral y se colocaron a equilibrar en la incubadora a 5% CO₂, 5% O₂, 38.5 °C y humedad relativa a saturación.

Transcurridas las 18 horas en las placas de fertilización, se realizó el proceso de denudación y desempaque (retirar las células del *cumulus oophorus*), para lo cual los ovocitos fertilizados de cada tratamiento fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 mL que contenían 600 µl de SOF + 100 µl de hialuronidasa atemperados a 38.5 °C, se esperó durante cinco minutos para que los ovocitos se precipitaran y luego se retiró entre 400-500 µl del sobrenadante, se llevaron los dos tubos al vórtex por tres minutos. Transcurrido este tiempo, se vació el contenido de cada tubo en una placa Petri X la cual contenía 800 µl de medio de cultivo SOF en cada uno de los cuatro pozos, se lavó cada tubo eppendorf tres veces con medio SOF, se procedió a la clasificación y selección de los ovocitos, fueron lavados tres veces y luego colocados en las microgotas flotantes de 100 µl medio de cultivo cubiertas con aceite mineral (400 µl) que se encontraban equilibrando, en proporción de 10 ovocitos fertilizados/microgota.

Al día tres de cultivo, se evaluó la tasa de división celular (clivaje) y se suplementó con el 10% de suero fetal bovino (10 µl/gota); al día ocho se evaluó la tasa de producción de mórulas y blastocistos en diferentes estadios. La determinación del desarrollo embrionario se realizó aplicando la ecuación 1:

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

Tratamientos

Se desarrollaron dos tratamientos:

MMO + cisteamina: 230 ovocitos en medio de maduración suplementado con 100 µM de cisteamina

MMO control: 261 ovocitos en Medio de Maduración sin suplementar (control).

Para determinar el grado de maduración, se tomaron como indicadores la expansión de las células del *cumulus oophorus*, de forma homogénea, densa y de coloración oscura, además de cada tratamiento se tomaron 69 y 48 ovocitos madurados de los tratamientos con cisteamina Sigma Aldrich y control respectivamente, los cuales fueron denudados depositando los ovocitos en una placa de Petri de 35 mm con 3 mL de medio MMO, fueron lavados dos veces y agitados con la pipeta y luego depositados en un tubo eppendorf de 1.5 mL que contenía 800 µl de MMO + 100 µl de hialuronidasa, se dejó decantar por cinco minutos y fueron llevados al vórtex por tres minutos, posteriormente fue lavado tres veces el tubo a fin de evitar que quedaran ovocitos adheridos. Se depositó en una placa Petri de 90 mm con MMO, se lavaron dos veces y luego fueron colocarlos en la placa Nunc™ de coloración protegida de la luz, la cual contenía en el pozo uno, tres y cuatro 400 µl de medio H-SOF (HEPES-SOF) y en el pozo dos 400 µl de medio Hoechst B2261 en H-SOF. Se pasaron los ovocitos del pozo uno al dos de coloración y fueron dejados por 10 minutos, luego fueron pasados al pozo tres y cuatro, lavados y colocados al microscopio de epifluorescencia utilizando el filtro DAPI (350/460), lo cual permitió observar el núcleo en Metafase II y el primer corpúsculo polar para los ovocitos madurados, mientras que los no madurados no se observaron ninguna de estas dos estructuras.

Variables Analizadas

Porcentaje de maduración *in vitro*

Porcentaje de ovocitos en Metafase II

Porcentaje de fertilización *in vitro*

Porcentaje de clivaje (división celular)

Porcentaje de apoptosis (muerte celular)

Porcentaje de embriones obtenidos (mórulas-blastocistos)

Eficiencia general del PIV (%)

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (MMO + cisteamina Sigma Aldrich y MMO control) y 261 y 230 ovocitos para el tratamiento control y cisteamina respectivamente. Se aplicó la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) utilizando el programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS® 2012 versión 9.4), con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$.

Resultados y Discusión

Para el tratamiento control se realizó la aspiración de 52 ovarios en los que se obtuvieron un total de 379 ovocitos aspirados, resultando un promedio de 7.29 ovocitos por ovario, obteniendo así un total de 261 ovocitos viables y 118 ovocitos degenerados, un promedio de 5.02 ovocitos viables/ovario y un promedio de 2.27 ovocitos degenerados/ovario.

Por otro lado, para el tratamiento con cisteamina se aspiraron 72 ovarios, de los cuales se obtuvo un total de 439 ovocitos aspirados, con un promedio de 6.10 ovocitos por ovario, de los cuales se obtuvo un total de 230 ovocitos viables y 209 ovocitos degenerados, dando un promedio de 5.02 ovocitos viables/ovario y 2.27 ovocitos degenerados/ovario.

Porcentaje de Maduración *in Vitro* (MIV)

El tratamiento con cisteamina presentó los mejores resultados ($P \leq 0.05$) de ovocitos madurados (86.52% y 77.78%, respectivamente), superando al tratamiento control en 8.74% (Cuadro 2; Figura 1 y 2). Los porcentajes de maduración de ambos tratamientos obtenidos en esta investigación superan los valores reportados por Martino et al. (1994) quienes obtuvieron un porcentaje de maduración de 56.9% por medio de la técnica de slicing. Por otra parte, el resultado de la suplementación con cisteamina en el medio de maduración es similar al resultado obtenido por Ponce y Rosero (2020), quienes lograron un 87.13% de ovocitos madurados con la suplementación de cafeína en el medio de maduración. Sin embargo, el porcentaje obtenido del tratamiento control fue mayor en un 7.24% en comparación con esta investigación.

Estos resultados coinciden con la investigación de Yoshida (1993) quien indica que la adición de cisteamina al medio de maduración de ovocitos bovinos incrementa los niveles de glutatión intracelular, el cual, acorde con Del Corso et al. (1994) el glutatión tiene entre sus funciones la protección de las células contra el daño oxidativo, lo cual se puede ver representado en una mejor tasa de maduración.

Según Tarazona A et al. (2010a) la adquisición de la competencia nuclear y citoplásmica ocurre durante dos fases del desarrollo del ovocito. La primera es de crecimiento, donde ocurren arreglos moleculares y reorganización de organelas en el ooplasma. La segunda fase, donde ocurre el reinicio de la meiosis para lograr finalmente el número haploide de cromosomas que se complementarán con los paternos para el desarrollo del nuevo individuo. De acuerdo a Peláez et al. (2012) el desarrollo del ovocito consta de las fases de crecimiento, capacitación durante la dominancia folicular y maduración final, que juega un papel clave en la adquisición de la competencia total para el desarrollo.

Camargo et al. (2006) establecen que algunos de los factores que afectan la producción *in vitro* de embriones se encuentran los folículos y la competencia ovocitaria, que aumenta en ovocitos aspirados de folículos de mayor tamaño. Los folículos de menor tamaño pueden ser menos competentes porque aún no alcanzan la competencia citoplasmática o porque ya están en un estado avanzado de atresia.

Porcentaje de Ovocitos en Metafase II (MII)

Al evaluar los resultados de los ovocitos que alcanzaron el estadio de Metafase II (MII) utilizando la técnica de la fluoresceína Hoechst B2261, el tratamiento con cisteamina presentó el mayor porcentaje de ovocitos en MII superando al tratamiento control en 15.62% ($P \leq 0.05$; Cuadro 2).

Los resultados indican que la suplementación con cisteamina durante la maduración *in vitro* ejerció un efecto favorable sobre el porcentaje de ovocitos bovinos que alcanzaron el estado de MII, mejorando con ello el porcentaje de MIV.

En bovinos y ovinos, se requiere 24 horas para la maduración *in vitro* para obtener un porcentaje superior al 85% de ovocitos madurados en estadios de Metafase II (Huanca et al. 2014). Cuando se alcanza el estadio de Metafase II, los ovocitos presentan una estructura denominada primer corpúsculo polar, que indica que se ha alcanzado la madurez nuclear (Figura 3).

Estos resultados difieren del estudio de Ratto (2005) donde se utilizaron tratamientos hormonales previos a la aspiración folicular para inducir el crecimiento folicular, contribuyendo a la maduración *in vivo* de los ovocitos, obteniendo 78% de ovocitos en estadio de Metafase II con un tiempo de maduración *in vitro* de 28 horas. Por otro lado, en una investigación realizada con la suplementación de 50 ng/mL (8.26 μ M) de EGF en se obtuvo 73% de ovocitos en Metafase II, sin embargo este no mostro un efecto estimulador sobre el porcentaje de metafase II. (Salgado et al. 2013)

Cuadro 2

Valores porcentuales de ovocitos madurados in vitro y en Metafase II (MII) para los tratamientos con cisteamina y control.

Tratamiento	Ovocitos madurados (%)	Ovocitos en Metafase II (%)
Cisteamina	86.52	85.19
Control	77.78	69.57
CV	7.1439	12.3805
Probabilidad	0.0121	0.0214

Nota. CV= coeficiente de variación

Figura 1

Ovocitos madurados 24 horas con cisteamina.

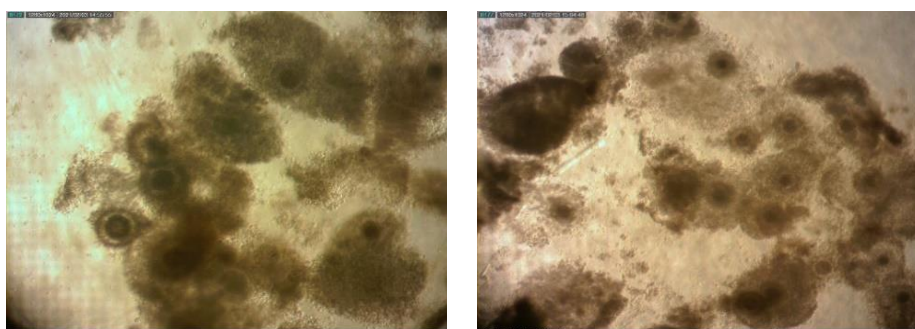
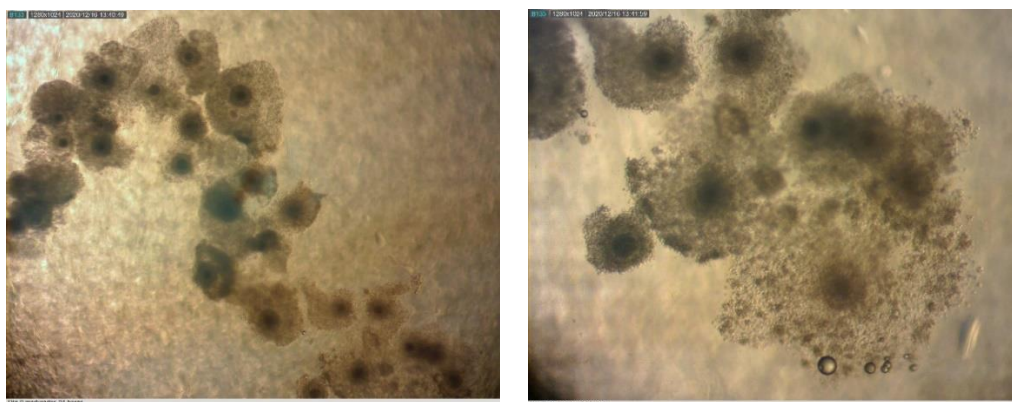
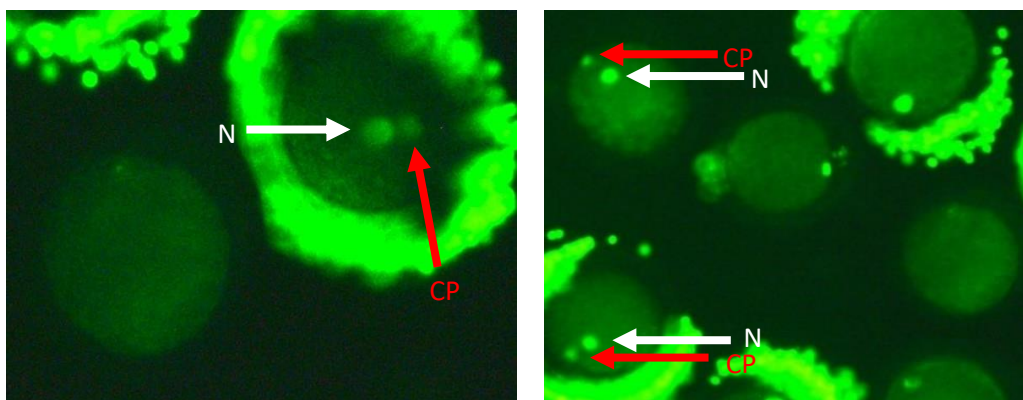


Figura 2

Ovocitos madurados 24 horas con tratamiento control

**Figura 3**

Ovocitos en estadio de Metafase II (MII). Las flechas blancas señalan el núcleo (N) y las rojas el primer cuerpo polar (CP).



Porcentaje de Fertilización

La fase de maduración tiene un gran impacto sobre las fases subsiguientes en los protocolos de fecundación *in vitro*. Debido a que, si existe una adecuada maduración del ovocito, se va favorecer la fecundación y el posterior desarrollo de los cigotos (Santa Cruz et al. 2014).

El tratamiento con cisteamina superó al tratamiento control ($P \leq 0.05$) en 11.39%, demostrando así que el uso de cisteamina en el medio de maduración mejora las tasas de ovocitos fertilizados (Cuadro 3). Los resultados de esta investigación son similares a los reportados por tres

ensayos de fertilización y cultivo de embriones *in vitro* donde se obtuvo una tasa de fertilización de 73.3%. Fernández et al. (2007) realizaron tres ensayos en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, con el objetivo de validar técnicas de fertilización *in vitro* y producción de embriones bovinos *in vitro*. Para estos ensayos de FIV se utilizaron dos placas de cultivo (Costar Falcon®) de cuatro celdas con la distribución de los ovocitos para determinar la tasa de fertilización, desarrollo embrionario y porcentaje de mórulas y blastocitos obtenidos. En el primer ensayo, se seleccionó un total de 168 ovocitos madurados en el medio HTF, de los cuales se fertilizaron 120, para una tasa de fertilización del 71.4%. En el segundo ensayo de un total de 186 ovocitos madurados *in vitro*, se fertilizaron 134, alcanzándose una tasa de fertilización del 72%. Para el tercer ensayo, de los 190 ovocitos seleccionados, 73 sufrieron proceso de segmentación (38.4%), alcanzándose una tasa de fertilización del 76.3%. La tasa de fertilización alcanzada fue del 73.3%, es decir, de los 544 ovocitos seleccionados, se lograron fertilizar 399 ovocitos. Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad del desarrollo e implementación de la técnica de FIV para la producción de embriones bovinos *in vitro* que permita aumentar la producción.

Porcentaje de Clivaje

Se calcula que en promedio los laboratorios pierden entre el 60 y el 70% de los oocitos madurados *in vitro*, debido a que posterior a la fertilización el cigoto es incapaz de sobrellevar el clivaje exitosamente y se bloquea antes de alcanzar el estadio de blastocisto, lo que se conoce como pérdida de la competencia ovocitaria (Tarazona AM et al. 2010b).

El tratamiento con cisteamina obtuvo los mejores resultados ($P \leq 0.05$) superando al tratamiento control en 16.96% (Cuadro 3; Figura 4). El resultado obtenido con el tratamiento control es similar a los resultados obtenidos por García J. y Martínez J. (2013) evaluando un protocolo de fertilización *in vitro* con un porcentaje de clivaje de 58.9% y 51.1%. Por otro lado, con respecto al resultado obtenido con la suplementación con cisteamina, es similar a los resultados obtenidos en un

estudio realizado por Ponce y Rosero (2020), para evaluar el efecto de la suplementación con cafeína en el medio de fertilización sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos, mencionan que el porcentaje de clivaje con la suplementación con cafeína y del tratamiento control fueron de 75.23% y 73.74%, respectivamente.

Los resultados obtenidos son mayores en comparación con la investigación realizada por Quintanilla et al. (2015) quienes obtuvieron porcentajes de 43.6 y 46.0% con la suplementación de cisteamina en el medio de maduración TCM-199.

Según los resultados de Villamil (2019), quien observó el promedio del clivaje de cada categoría bajo cinco réplicas cada una, donde de los 280 ovocitos categoría I se obtuvo un promedio de clivaje del 61.4% y un 52% de 589 ovocitos categoría II, mientras que la categoría III y IV con 104 y 99 ovocitos tuvieron promedios del 26% y 12% respectivamente. Mostrando resultados menores de porcentaje de clivaje en comparación con los obtenidos con la suplementación con cisteamina.

Porcentaje de Apoptosis

Según Zamora et al. (2005) la apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular asociado a ciertos cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que requieren una regulación coordinada de genes específicos. Su función principal es mantener los tejidos y órganos de una muerte celular controlada para así lograr un adecuado balance entre la muerte y la proliferación celular.

Ortega y Ariza (2012) establecen que la apoptosis es un proceso ordenado, altamente regulado y dependiente de ATP, apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico que juega un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis tisular de los organismos. De igual manera menciona que existen dos vías principales por las cuales se puede disparar el mecanismo de muerte celular programada. La primera es la generada por señales celulares dentro de la célula activada cuando se inducen daños oxidativos en la mitocondria y la segunda es la inducción de la apoptosis por medio de activadores de muerte celular que se unen a receptores específicos en la membrana celular.

Sirini MA. et al. (2016) han demostrado, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, que las células de la granulosa mueren a través del proceso activo de apoptosis, la información sobre este fenómeno en células del *cumulus* (CC) durante la maduración *in vitro* (MIV) es todavía muy limitada. En algunos estudios se ha encontrado una relación inversa entre la tasa de apoptosis de las CC que rodean al ovocito y su capacidad de desarrollo posterior.

Si el índice apoptótico es elevado la presencia masiva de células muertas podría dañar la homeostasis del embrión y consecuentemente detener su desarrollo y morir. No obstante, el umbral de apoptosis que es detrimental para el desarrollo temprano aún no se ha establecido en las diferentes especies. Se sabe que los embriones no competentes no culminan el clivaje exitosamente y se bloquea su desarrollo antes de alcanzar el estadio de blastocisto, mientras que los competentes regulan la presentación de apoptosis y alcanzan los estadios preimplantatorios (Tarazona AM et al. 2010b).

La apoptosis es el fenómeno celular que se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos de las células (Elvir 2019). Los resultados obtenidos para apoptosis difirieron ($P \leq 0.05$) entre tratamientos (Cuadro 3), siendo el tratamiento con cisteamina el que presentó un porcentaje menor de muerte celular programada, mientras que el control tuvo un porcentaje más alto, 24.52% y 41.48%, respectivamente (Figura 4 y 5). Los resultados obtenidos en este estudio con la suplementación con cisteamina son mejores en comparación con los obtenidos por (García J. y Martínez J. 2013) quienes validando un protocolo de fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano, obtuvieron un 44.5% de apoptosis.

Cuadro 3

Valores Porcentuales de Ovocitos Fertilizados en Clivaje y Apoptosis al Día Tres para los Trtamientos con Cisteamina y Control

Tratamiento	Ovocitos Fertilizados (%)	Ovocitos	
		Clivaje al día 3 (%)	Apoptosis al día 3 (%)
Cisteamina	77.89	75.48	24.52
Control	66.5	58.52	41.48
CV	8.8763	13.3603	21.1051
Probabilidad	0.0109	0.0021	

Figura 4

Clivaje de ovocitos en tratamiento con cisteamina. Izquierda: muestra un grupo de ovocitos en proceso de división celular. Derecha: ovocito superior en proceso de división celular, nótese la línea divisoria; ovocito inferior fertilizado, nótese la presencia del segundo cuerpo polar

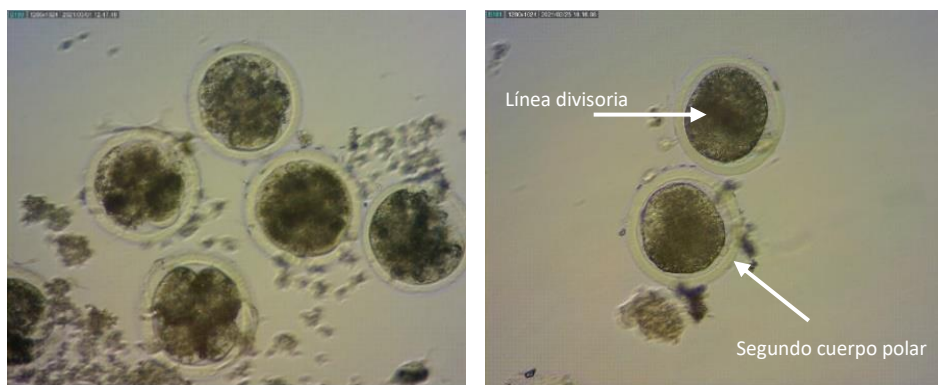
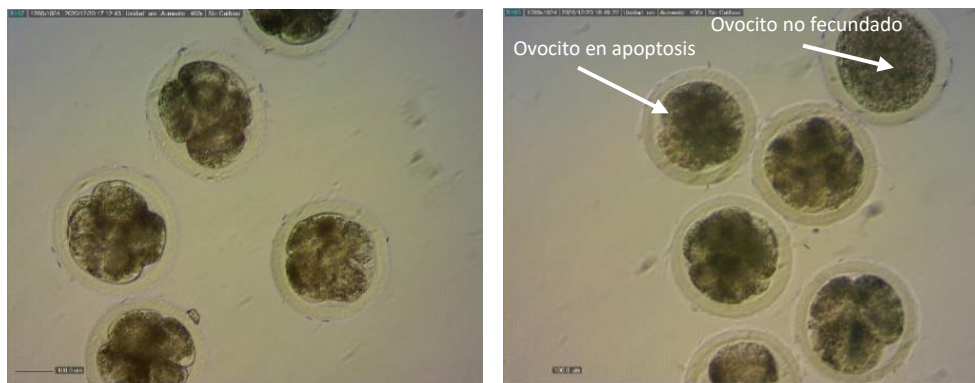


Figura 5

Clivaje de ovocitos en el tratamiento control



Porcentaje de Mórulas y Blastocistos

La adición de 100 μ M al medio de maduración *in vitro*, contribuye con un aumento en el porcentaje de embriones que lleguen a la etapa de blastocistos, sin influenciar las tasas de maduración y con efecto positivo en la calidad de los mismos (Quintanilla et al. 2015). Looney et al. (2006) establecen que la transferencia de una mórula temprana resulta en menores tasas de preñez que cuando se transfieren embriones de estadio más avanzado.

El tratamiento con cisteamina presentó el mayor porcentaje de blastocistos superando al control ($P \leq 0.05$) en 27.29% (Cuadro 4). Así mismo, el mayor porcentaje de mórulas fue con el control superando el tratamiento con cisteamina con resultados de 67.57% y 40.28%, respectivamente (Figura 6). Los resultados obtenidos son mayores en comparación con los reportados por Quintanilla et al. (2015) quienes utilizando el efecto de la cisteamina y del medio de cultivo sobre la tasa de blastocistos obtuvieron un porcentaje de 20.9 y 18.6. Estudios anteriores han demostrado que la estimulación con cisteamina durante la maduración de oocitos ha tenido un efecto positivo ya que un número mayor de blastocitos aparecieron durante día 6 y 7 del cultivo, con respecto al control. Esto demuestra que cuando la GSH es estimulada durante la maduración de oocitos bovinos *in vitro* se obtienen embriones que desarrollan más rápido ya que llegan a blastocisto en el día 6 del cultivo y son aptos

para sobrevivir al proceso de congelamiento y/o obtener mayores tasas de preñez a la transferencia en las receptoras (DeMatos 1999). Aunque no es posible medir el número de blastómeros antes de la transferencia del embrión, se cree que embriones con un número mayor de células es más probable que se implante y de lugar a una descendencia viva (van Soom et al. 1997).

Porcentaje de Embriones

Por otro lado, con la cisteamina se obtuvieron mayores porcentajes de embriones totales con respecto al control ($P \leq 0.05$). El uso de cisteamina en el medio de maduración mejoró la tasa de desarrollo embrionario, ya que se obtuvieron altos porcentajes de embriones (blastocistos y mórulas totales). Según Oyuela y Jimenez (2010), la transferencia de una mórula temprana resulta en menores tasas de preñez que cuando se transfieren embriones en estadio más avanzado, esto se debe a que al transferir un embrión cuyo desarrollo haya sido más rápido, este podría expresar más rápidamente los factores de reconocimiento de preñez, comparado con un contemporáneo de menor desarrollo. Al igual que Hasler et al. (1987) obtuvieron resultados con mayor porcentaje de preñez en blastocistos tempranos que en transferencia de mórulas. En esta investigación se obtuvieron valores mayores en comparación con un estudio realizado por Karaşahin y Arikan (2015), quienes utilizaron 100 μM de ácido linoleico y ácido oleico, los resultados fueron de 11.81% y 28.57%, respectivamente. Se encontró que el ácido oleico tenía un efecto obvio en términos de calidad y tamaño de los embriones.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una diferencia significativa entre los embriones generados por los tratamientos (Cuadro 4) donde el tratamiento con cisteamina mostró un aumento de la producción de embriones, con una diferencia de 14.7% en comparación con el tratamiento control. Estudios anteriores han demostrado que la cisteamina presente durante la maduración de ovocitos porcinos incrementaba el porcentaje de desarrollo de los embriones.

Cuadro 4

Valores porcentuales de embriones y su categoría para los tratamientos con cisteamina y control

Tratamiento	Embriones (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
Cisteamina	61.54	40.28	59.72
Control	46.84	67.57	32.43
CV	12.648	23.736	26.341
Probabilidad	0.0421	0.007	

Nota. CV=coeficiente de variación

Eficiencia General de la PIV

Santa Cruz et al. (2014) determinaron que la fase de maduración *in vitro* tiene un gran impacto sobre las fases subsiguientes en los protocolos de fecundación *in vitro*, esto debido a que, si existe una adecuada maduración del ovocito, se obtienen embriones con características que favorecen la fecundación. Se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos con cisteamina y el control, siendo el tratamiento con cisteamina el que mostró los mejores resultados en las relaciones de embriones producidos/ovocitos viables, embriones producidos/ovocitos madurados, embriones producidos/ovocitos fertilizados y embriones producidos/ovocitos en clivaje superando siempre al control en 17.12%, 17.95%, 19.04% y 14.70%, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5

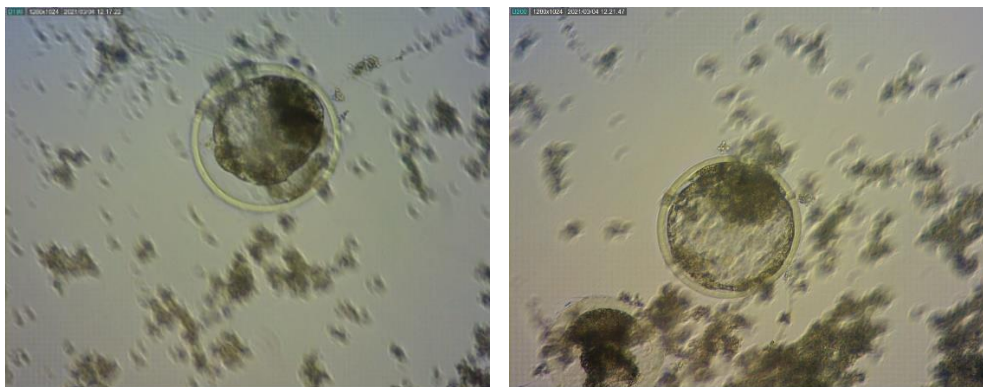
Eficiencia del procedimiento de PIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y en clivaje

Tratamiento	Embriones/ ovocitos viables (%)	Embriones/ovocitos madurados (%)	Embriones/ovocitos fertilizados (%)	Embriones/ovocitos en clivaje (%)
Cisteamina	31.30	36.18	46.45	61.54
Control	14.18	18.23	27.41	46.84
CV	29.9716	26.5841	21.6187	12.6480
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	0.0008	0.0421

Nota. CV=coeficiente de variación

Figura 6

Izquierda: blastocisto en el tratamiento control al día 7; Derecha: blastocisto expandido en el tratamiento con cisteamina al día 7.



Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, los mayores porcentajes de maduración, fertilización y clivaje se obtuvieron con la suplementación de cisteamina en el medio de maduración *in vitro*.

El mayor porcentaje de ovocitos madurados en estadio de Metafase II se obtuvo en el tratamiento con la suplementación de cisteamina.

El mayor porcentaje de embriones totales obtenidos, el mayor porcentaje de blastocistos y la mejor eficiencia en todo el procedimiento de PIV, se obtuvo con el tratamiento con la suplementación de cisteamina en el medio de maduración.

Recomendaciones

Utilizar la suplementación con cisteamina en el medio de maduración *in vitro* en el laboratorio de reproducción animal de Zamorano.

Evaluar la suplementación con diferentes concentraciones de cisteamina en el medio de maduración *in vitro*.

Evaluar las tasas de preñez en las receptoras utilizando los embriones producidos con y sin cisteamina.

Referencias

- Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. 59(3-4):939–949. doi:10.1016/S0093-691X(02)01125-1.
- Bernal B. 2016. Influencia de la suplementación del medio de maduración y de cultivo en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos *in vitro*. Córdoba: Universidad de Córdoba. 97 p; [consultado el 13 de jul. de 2022]. <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/4609/Bernal%20Ballesteros.%20Influencia%20de%20la%20suplementaci%3b3n%20del%20medio%20de...%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol of Reprod*. 27(1):147–158. eng. doi:10.1095/biolreprod27.1.147.
- Camargo L, Viana J, Sa W, Ferreira A, Ramos A, ValeFilho V. 2006. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod*; [consultado el 13 de jul. de 2022]. 3(1):19–28. <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/AR072%20Camargo%20pag19-28.pdf>.
- Crespo J, Guamán E. 2015. Fertilización *in vitro* en bovinos en el laboratorio de reproducción animal de Zamorano utilizando el protocolo de genes diffusion. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 35 p; [consultado el 12 de jul. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/7f33e203-b4f0-461f-85d8-5fbf9872e24f/content>.
- Del Corso A, Capiello M, Mura U. 1994. Thiol dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *International Journal of Biochemistry*. 26(6):745–750. doi:10.1016/0020-711X(94)90103-1.
- DeMatos D. 1999. Producción de embriones de bovinos *in vitro*: estimulación de la síntesis de glutathione durante la maduración *in vitro* de ocitos y su efecto sobre el desarrollo de los embriones. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires. 214 p; [consultado el 17 de jul. de 2022]. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3135_DeMatos.pdf.
- DeMatos D, Furnus C, Moses D, Baldassarre H. 1995. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev*. 42(4):432–436. eng. doi:10.1002/mrd.1080420409.
- Elvir M. 2019. Efecto del uso de dos macrooleculas en el medio de maduración de oocitos sobre la tasa de producción de embriones *in vitro* en bovinos. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; [consultado 21/06/22]. [file:///D:/OneDrive%20-%20Zamorano/Downloads/PEG%20FINAL%20Biblioteca%20\(2\).pdf](file:///D:/OneDrive%20-%20Zamorano/Downloads/PEG%20FINAL%20Biblioteca%20(2).pdf).
- Fernández A, Díaz T, Muñoz G. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev. Fac. Cs. Vets*; [consultado el 18 de jul. de 2022]. 48(1):51–60. <http://ve.scielo.org/pdf/rfvc/v48n1/art06.pdf>.
- Filipiak Y, Larocca C. 2010. Manual de fertilización *in vitro* en bovinos. Montevideo, Uruguay; [consultado 17/07/22]. https://www.researchgate.net/publication/230801504_Manual_de_Fertilizacion_In_Vitro_en_Bovinos.

- García J., Martínez J. 2013. Implementación de un protocolo de fertilización *in vitro* en bovinos en el laboratorio de reproducción animal de Zamorano. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 34 p; [consultado el 12 de jul. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/f4e05f90-bc89-43b1-9b20-7edc84063824/content>.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*. 27(1):139–168. doi:10.1016/0093-691X(87)90075-6.
- Hernández A, Hernández H. 2010. L-cysteine supplementation effect on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Rev. cient*; [consultado 21/07/22]. 20(3). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300008.
- Hincapié J. 2019. La fertilización *in vitro* (FIV) en bovinos: una biotecnología reproductiva innovadora al servicio del mejoramiento genético. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; [actualizado el 13 de jun. de 2022; consultado el 12 de jul. de 2022]. <https://www.zamorano.edu/2019/03/13/la-fertilizacion-in-vitro-fiv-en-bovinos-una-biotecnologia-reproductiva-innovadora-al-servicio-del-mejoramiento-genetico/>.
- Huanca A, Rosario C, Chileno M, García P, Cainzo J, Becerra J. 2014. Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división postfecundación *in vitro* de ovocitos de alpaca. *Rev Inv Vet Perú*. 25(4):468–476. doi:10.15381/rivep.v25i4.10782.
- Karavaşin T, Arikan S. 2015. The effect of oleic and linoleic acids on *in vitro* bovine embryonic development and embryo quality. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 39(2):154–159. <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol39/iss2/6>. doi:10.3906/vet-1404-18.
- Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW. 2006. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*. 65(1):201–209. eng. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.023.
- Luciano A, Modina S, Vassena R, Milanesi E, Lauria A, Gandolfi F. 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Biol Reprod*. 70(2):465–472. eng. doi:10.1095/biolreprod.103.020644.
- Martino A, Palomo MJ, Mogas T, Paramio MT. 1994. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*. 42(5):859–873. doi:10.1016/0093-691X(94)90454-Q.
- Meister A. 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*. 220(4596):472–477. eng. doi:10.1126/science.6836290.
- Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de medicina veterinaria*. 38(2):97–104. doi:10.4067/S0301-732X2006000200002.
- Ortega R, Ariza M. 2012. El mecanismo de muerte celular programada y su importancia en el proceso de maduración de la carne bovina. *Rev. Med. Vet*; [consultado el 18 de jul. de 2022]. (23):83. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n23/n23a09.pdf>. doi:10.19052/mv.77.
- Ortega R, Palma G, Vacacela W, Carrera R. 2022. La cisteamina y sus aplicaciones en la producción *in vitro* de embriones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 33(1). doi:10.15381/rivep.v33i1.20134.

- Oyuela LA, Jimenez C. 2010. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 57(3):191–200. es.
- Peláez J, Urribarrí Y, Pirela A, Báez F, Villamediana P, Hernández H. 2012. Influencia de la predominancia racial sobre la competencia de maduración, fecundación y desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos. *Rev. Univ Zulia*; [consultado el 13 de jul. de 2022]. (5):21–42. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/rluz/article/view/12672/12660>.
- Ponce K, Rosero K. 2020. Efecto de la suplementación con cafeína en el medio de fertilización sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 32 p; [consultado el 9 de jul. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/3da6c826-ecf6-4b8e-b319-1c12f81d6ab8/content>.
- Quintanilla L, Huanca W, Córdova A, Ampuero A, Benavides L. 2015. Efecto de la suplementación del medio de maduración con cisteamina y de dos medios de cultivo (KSOMaa y SOF) en la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 26(3):462. doi:10.15381/rivep.v26i3.11178.
- Ratto M. 2005. Ovarian follicular synchronization, ovulation and oocyte development in llamas and alpacas. Saskatoon: Medical Sciences University of Saskatchewan. 185 p; [consultado el 18 de jul. de 2022]. <https://harvest.usask.ca/bitstream/handle/10388/etd-07192005-192753/MarceloRattoPhD.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Salgado R, Simanca J, Vergara O. 2013. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados *in vitro*. *Revista Científica*; [consultado el 30 de jun. de 2022]. 23(4):325–328. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95926991004.pdf>.
- Santa Cruz C, Huanca W, Condori R, Ampuero A. 2014. Uso de macromoléculas sobre la tasa de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos. *Rev Inv Vet Perú.* 25(4):487–493. doi:10.15381/rivep.v25i4.10799.
- Sirini MA, Nikoloff N, Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, am Pascua, Testa JA, Furnus C. 2016. Efecto de la suplementación con ghrelina al medio de cultivo sobre la frecuencia de apoptosis de células del cúmulus. *Tercera Época.* 6(4). es. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/57314>.
- Tarazona A, López A, Olivera M. 2010a. La competencia del ovocito: qué, cómo y cuándo. *Acta biol. Colomb*; [consultado el 13 de jul. de 2022]. 15(3):3–18. <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027886001.pdf>.
- Tarazona AM, Olivera-Angel M, Lenis YY. 2010b. Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Arch. Med. Vet.* 42(3):125–133. doi:10.4067/S0301-732X2010000300003.
- Urrego R, Tarazona, A, Olivera M, Camargo, O. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev. Colomb. Cien. Pecuarias*; [consultado el 18 de jul. de 2022]. 21(3):398–405. <https://www.redalyc.org/pdf/2950/295023540009.pdf>.
- van Soom A, Boerjan M, Bols P, Vanroose G, Lein A, Coryn M, Kruif A. 1997. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. *Biol Reprod.* 57(5):1041–1049. eng. doi:10.1095/biolreprod57.5.1041.
- Villamil E. 2019. Tasa de clivaje con semen congelado de toros brahman en fertilización *in vitro* durante abril a septiembre del 2018. Colombia: Universidad de ciencias aplicadas y ambientales. 33 p;

[consultado el 9 de jul. de 2022]. <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/2763/CASO%20CLINICO%20%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Yoshida M. 1993. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes *in vitro*. Molecular reproduction and development. 35(1):76–81. eng. doi:10.1002/mrd.1080350113.

Zamora J, Otárola I, Brenes O. 2005. La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. Rev. chil. nutr. 32(3). doi:10.4067/S0717-75182005000300002.

Anexos

Anexo A

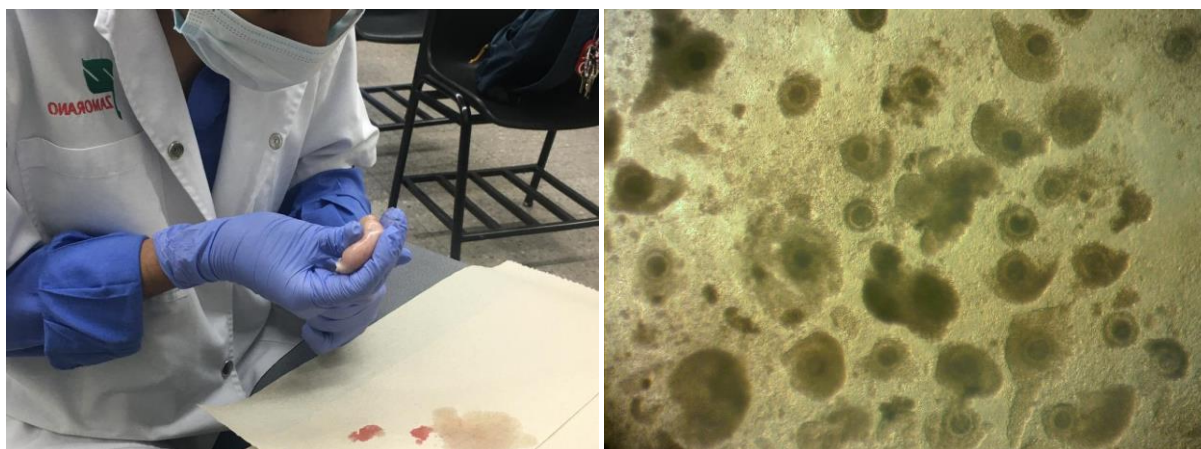
Acondicionamiento de Ovarios

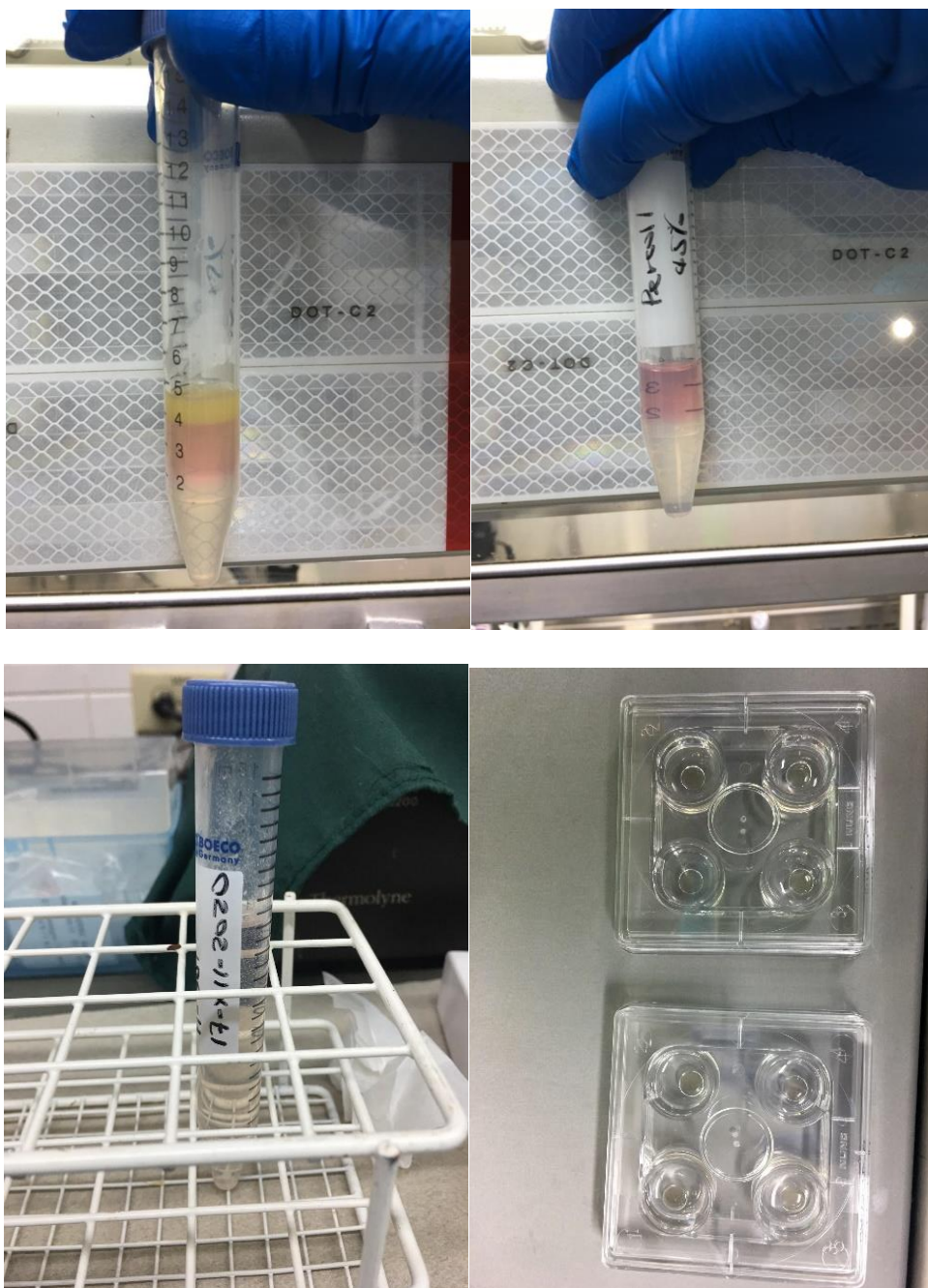


Anexo B

Preparación de Medios de Colección y Maduración



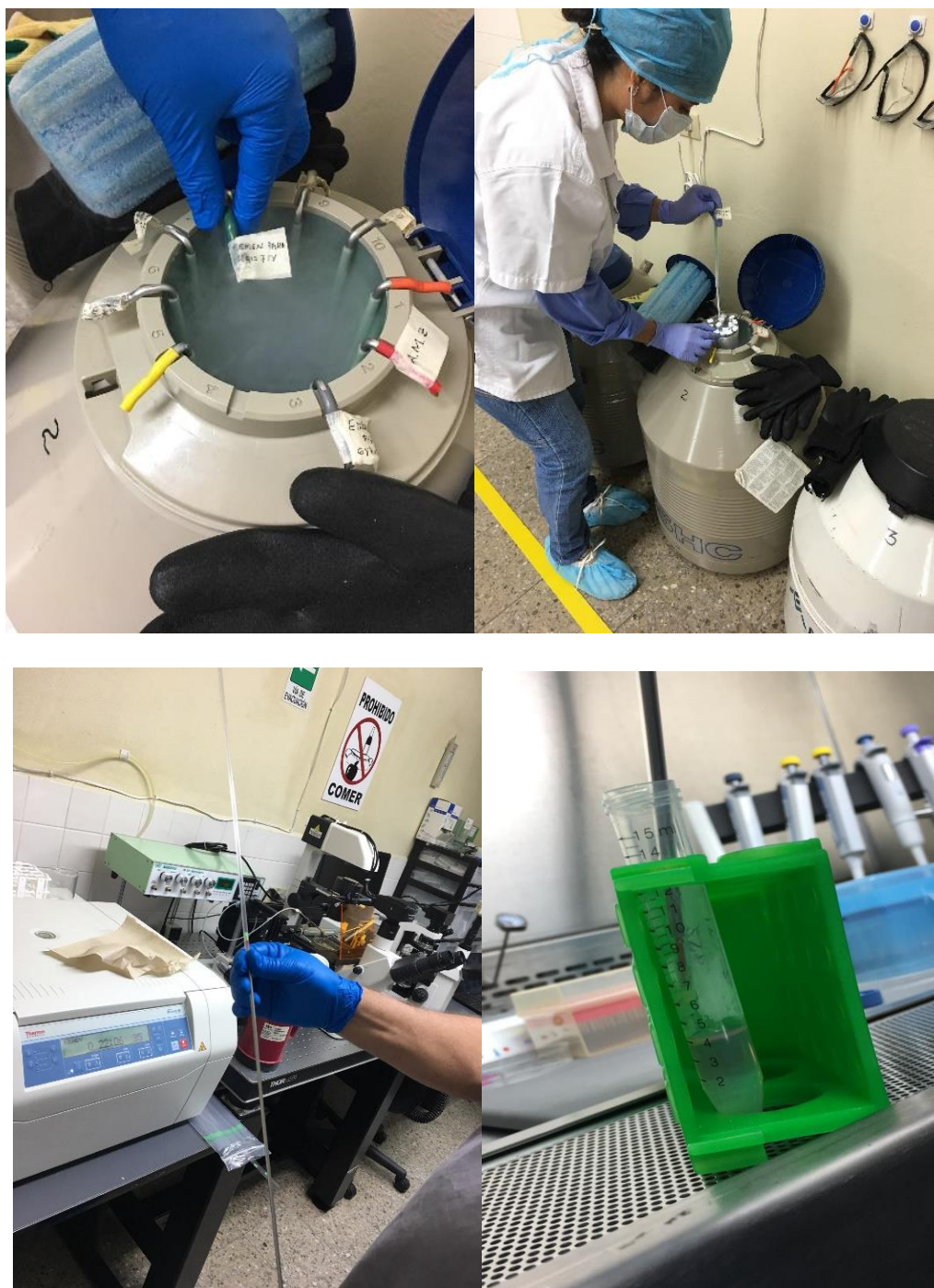
Anexo C*Aspiración folicular*

Anexo D*Medio para acondicionamiento y capacitación de semen*

Anexo E

Ovocitos madurados transferidos a placas Nunc™ de fertilización



Anexo F*Descongelación del semen*

Anexo G

Composición de solución transporte

Componente	Cantidad
solución salina fisiológica	0.9%
estreptomina	0.5 g/litro
penicilina G	100,000 UI/litro

Preparación del medio de colección de ovocitos inmaduros.

Componente	Cantidad
Solución Stock de Minitube MCO 19990/0050	10 ml
Suero Albumina Bovino EFAF	60 mg

Preparación del medio 10X SP-TL para el Percoll 90% utilizado en Fertilización in vitro en bovinos.

Componente	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. HEPES= N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

TL= Tyrode Lactato

Preparación del medio de acondicionamiento y capacitación del semen.

Componente	Cantidad
Minitube medio de capacitación 19990/0020	20 ml
Suero Albumina Bovino EFA	120g
Piruvato de Sodio	1000 µl
Gentamicina	2000 µl

Preparación del medio de maduración de ovocitos.

Componente	Cantidad
Solución stock de Minitube 19990/0010	9 mL
Suero de Vaca en Celo	1ml
FSH	100 µl
LH	50 µl
Cisteamina Sigma Aldrich	100 µl

Nota. FSH= Follicular Stimulant Hormone; LH= Luteinizing Hormone

Preparación del medio de fertilización.

Componente	Cantidad
Medio de fertilización de Minitube 19990/0030	10 mL
Suero Albumina Bovino EFAF	60 mg
Piruvato de sodio	100 µl
Heparina	200 µl

Preparación del medio de cultivo

Componente	Cantidad
SOF Minitube 19990/0041	10 mL
Suero de vaca en celo	1ml
Aminoácidos esenciales	400 µl
Aminoácidos no esenciales	100 µl
Gentamicina	60 µl

Nota. SOF=Sintetic Oviduct Fluid

Preparación de Cisteamina stock

Componente	Cantidad
Cisteamina	5g
TCM-199 + bicarbonato de sodio	33.33ml

Nota. TCM= Tissue Culture Medium