

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencia Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### **Efecto del Resveratrol sobre la capacidad fecundante *in vitro* de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados**

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista


**Autor:**

Brian Oswaldo Aguirre Narea

Byron Alexander Campoverde Guailacela

**Director:**

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

**Cuenca, Ecuador**

2023-10-27

## Resumen

Esta investigación evaluó el efecto del Resveratrol (RES) sobre la cinemática y capacidad fecundante in vitro de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados. Cuatro tratamientos fueron evaluados según la suplementación con RES (0 [control] y 50  $\mu$ M) y el tipo de criopreservación (congelación convencional [CC] y vitrificación [VIT]): CC-RES (n=80 pajuelas); CC-Co (n=80 pajuelas); VIT-RES (n=20 criotubos), y VIT-Co (n=20 criotubos). Cada tratamiento fue evaluado objetivamente su cinemática y la capacidad fecundante mediante un sistema CASA(SCA®) y fecundación in vitro (200 ovocitos/tratamiento), respectivamente. Los resultados demostraron una mejor crio-respuesta cinemática con los tratamientos de congelación (CC-RES y CC-Co) que con los de vitrificación (VIT-RES y VIT-Co). El tratamiento de CC-RES produjo una mayor ( $P<0,05$ ) motilidad total (MT) y progresiva (MP) que el tratamiento CC-Co; mientras que el tratamiento VIT-RES produjo una mayor ( $P<0,05$ ) frecuencia de batida de flagelo (BCF) que el tratamiento VIT-Co. El tratamiento CC-RES produjo una mayor ( $P<0,05$ ) tasa de clivaje que los tratamientos CC-Co y VIT-RES (64,0 $\pm$ 3,40 % vs. 34,7 $\pm$ 3,44 % y 42,0 $\pm$ 4,96 %, respectivamente). Asimismo, el tratamiento CC-RES produjo un porcentaje de blastocistos más alto ( $P<0,05$ ) que todos los tratamientos (CC-RES= 22,5 $\pm$ 3,11 % vs. CC-Co= 10,2 $\pm$ 2,29 %; VIT-RES= 8,0 $\pm$ 3,88 %; y VIT-Co= 4,0 $\pm$ 2,8 %). Además, una correlación ( $P<0,05$ ) fue evidenciada en el tratamiento CC-RES entre las motilidades y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, y las tasas de clivaje y blastocistos. En conclusión, el RES mejoró las motilidades y la fertilidad in vitro de espermatozoides después de la congelación, sin embargo; en la vitrificación solo mejoró un parámetro cinético.

*Palabras clave:* ovocitos bovinos, fecundación in-vitro, congelación, vitrificación, resveratrol



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

### Abstract

This research evaluated the effect of Resveratrol (RES) on the kinematics and in vitro fertilizing capacity of frozen and vitrified bovine spermatozoa. Four treatments were evaluated according to RES supplementation (0 [control] and 50  $\mu$ M) and cryopreservation method (conventional freezing [CF] and vitrification [VIT]): CF-RES (n=80 straws); CF-Co (n=80 straws); VIT-RES (n=20 cryotubes), and VIT-Co (n=20 cryotubes). Each treatment was objectively evaluated for its kinematics and fertilizing capacity using a Computer Assisted Sperm Analysis system (CASA®) and in vitro fertilization (200 oocytes/treatment), respectively. Results showed better cryoresponse kinematics with freezing treatments (CF-RES and CF-Co) than with vitrification treatments (VIT-RES and VIT-Co). The CF-RES treatment produced a higher ( $P<0.05$ ) total motility (TM) and progressive motility (PM) than the CF-Co treatment, while the VIT-RES treatment produced a higher ( $P<0.05$ ) beat cross frequency (BCF) than the VIT-Co treatment. The CC-RES treatment produced a higher ( $P<0.05$ ) cleavage rate than the CF-Co and VIT-RES treatments ( $64.0\pm 3.40\%$  vs.  $34.7\pm 3.44\%$  and  $42.0\pm 4.96\%$ , respectively). Likewise, the CF-RES treatment produced a higher percentage of blastocysts ( $P<0.05$ ) than all treatments (CF-RES= $22.5\pm 3.11\%$  vs. CC-Co= $10.2\pm 2.29\%$ ; VIT-RES= $8.0\pm 3.88\%$ ; and VIT-Co= $4.0\pm 2.8\%$ ). Furthermore, a correlation ( $P<0.05$ ) was evidenced in the CC-RES treatment between motilities and lateral head displacement amplitude, and cleavage and blastocyst rates. In conclusion, RES improved the motility and in vitro fertility of spermatozoa after freezing, however, in vitrification it only improved one kinetic parameter

*Keywords:* bovine oocytes, in-vitro fertilization, freezing, vitrification, resveratrol



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

**Institutional Repository:** <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

## Índice de contenido

Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	7
Agradecimientos .....	8
Dedicatorias.....	9
Introducción .....	10
1.1    Objetivos .....	12
1.1.1    Objetivo general .....	12
1.1.2    Objetivos específicos.....	12
1.1.3    Hipótesis .....	12
Revisión de literatura .....	13
2.1    Antecedentes a la Fecundación in vitro (FIV) .....	13
2.1.1    Obstáculos en la fecundación.....	13
2.1.2    Mecanismos que intervienen en la fecundación .....	13
2.1.3    Recuperación de ovocitos .....	14
2.2    Métodos de criopreservación.....	14
2.2.1    Congelación convencional.....	14
2.2.2    Congelación ultrarrápida (Vitrificación) .....	15
2.3    Antioxidantes en la criopreservación .....	15
2.3.1    Tipos de Antioxidantes .....	16
2.4    Producción in vitro de embriones .....	18
2.5    Obtención de COC´S .....	19
2.6    Maduración in vitro (MIV) .....	19
2.7    Fecundación in vitro (FIV) .....	19
2.8    Cultivo in vitro (CIV) .....	20
Materiales y métodos.....	21
3.1    Materiales.....	21

3.1.1	Físicos .....	21
3.1.2	Biológicos .....	21
3.1.3	Reactivos .....	22
3.2	Medios para la Producción in vitro de embriones bovinos (PIVE) .....	22
3.3	Diseño experimental.....	24
3.4	Metodología .....	25
3.4.1	Evaluación de la cinemática .....	25
3.4.2	Evaluación de la capacidad fecundante.....	26
3.4.3	Correlación entre variables espermáticas de progresividad y fertilidad.....	27
3.5	Análisis estadísticos .....	27
Resultados.....		28
3.1	Cinemática espermática .....	28
3.1	Capacidad fecundante.....	29
4.3	Correlación entre cinemática y fertilidad.....	30
Discusión .....		31
Conclusiones .....		35
Referencias.....		36
Anexos.....		45

## Índice de figuras

<b>Tabla 1:</b> Medio MIV (maduración in vitro) .....	22
<b>Tabla 2:</b> Medio FIV (FIV-TL-ST- $\mu$ MU).....	22
<b>Tabla 3:</b> Medio para la preparación de espermatozoides stock (Sperm-Talp) .....	23
<b>Tabla 4:</b> Medio de CIV (CIV-CR2) .....	23
<b>Tabla 5:</b> Valores de las variables cinemáticas de muestras espermáticas de bovinos congelados o vitrificados con Resveratrol .....	28
<b>Tabla 6:</b> Correlación entre variables cinéticas de progresividad y de fertilidad in vitro (clivaje y de blastocistos). .....	30

## Índice de tablas

**Figura 1:** Tasa de división celular (clivaje) y de producción de blastocistos. Letras diferentes en cada barra y cada parámetro expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b).

..... 29

## **Agradecimientos**

En primera instancia agradecer al ser creador y especialmente a nuestra familia y a las amistades formadas en las instalaciones de nuestra facultad quienes nos dieron la oportunidad de hacer todo esto posible.

Un especial agradecimiento al Doctor Diego Andrés Galarza, quien se convirtió en nuestro guía, maestro y amigo, siendo el pilar fundamental para la realización y culminación de la presente investigación; también extendemos nuestros agradecimientos al Dr. Xavier Samaniego y Dr. Mauricio Dumas, técnicos docentes del laboratorio de biotecnología, quienes nos brindaron su apoyo y formidable experiencia en el trabajo práctico.

Finalmente, un agradecimiento a la ilustre Universidad de Cuenca y principalmente al cuerpo docente que conforma la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por todos los conocimientos y experiencias impartidas a lo largo de nuestra formación académica y personal.

**Brian, Byron.**



### Dedicatorias

A Dios y a mi madre, Dalila Narea, una mujer valiente y decidida que supo salir adelante sola, mi apoyo incondicional, que con su amor y confianza me ha ayudado a cumplir todas las metas que me he planteado. Todo lo que soy y lo que seré se lo debo a ella.

A mi abuela Julia Tenesaca, mi tía Elizabeth y mi prima Vane que han sido mi guarda e inspiración, siempre a mi lado con sus palabras de aliento y cariño. A mi tío Braulio Narea, que hoy no está entre nosotros, pero su presencia me cuidará y guiará eternamente.

A mis familiares y su continuo apoyo, en especial mis tíos Pablo, Carmen y mis primos Diego, Patricia y Pablo; a mis mejores amigos Byron, Lenin, Juan y todos los que aún están; a los colegas que esta hermosa profesión me ha dado la oportunidad de conocer; a una persona especial y maravillosa (SF); a mi compañero de tesis con el que compartí la responsabilidad, y finalmente, pero no menos importante a mi mascota Snarf que me ha acompañado 18 años de su vida. Gracias totales.

**Brian Aguirre.**

Este logro está dedicado principalmente a mis padres Salustino Campoverde y Olimpia Guailacela quienes fueron las personas más importantes en mi vida, me brindaron su compañía, me llenaron de cariño, amor, valores e inspiración y se convirtieron en los cimientos para ser la persona que soy y cumplir todo lo que jamás pensé que llegaría a lograr, gracias por existir, faltó muy poco para que vean mis sueños cumplir, todo lo que soy se los debo y los dedico a ustedes.

A mis hermanos y cuñados Patricio, Nolo, Marica, Nino, Norma, Tamara, Merci, Noe, quienes a pesar de todo nunca me dejaron solo y me han ayudado a culminar mis metas. A mis sobrinos, Christian, Alex, Joel, Danita y Jostin quienes siempre han estado conmigo y son una inspiración para ser cada vez mejor. A mi primos, tíos y amigos especialmente a Merci, Mauricio, Cecilia, Paola quienes ha demostrado que la amistad y generosidad son sus más grandes virtudes, gracias por siempre haberme ayudado. A mis amigos y futuros colegas, Jennifer, Nicole, Teresa, Mafer, Brian, David, Walter, Vlady y todos aquellos que compartieron conmigo muchas experiencias, hicieron de la universidad un buen lugar y me motivaron a conseguir todo lo que me he propuesto.

**Byron Campoverde.**

## Introducción

La ventaja más importante de la criopreservación de espermatozoides es la conservación del material genético de animales genéticamente importantes durante un tiempo indefinido. Sin embargo; este procedimiento criogénico supone daños celulares y funcionales como la degeneración de las membranas espermáticas, interrupción de la membrana mitocondrial, daño del ADN y, en consecuencia, una disminución tanto de la motilidad (desplazamiento indeseable) como de su capacidad fecundante (Stornelli et al., 2005). Si bien, alrededor del 50% de espermatozoides bovinos sobreviven a la criopreservación, no todos estos se mantienen íntegros y funcionales, sino solamente una pequeña subpoblación espermática mantiene su fertilidad (Watson, 2000; Skidmore et al., 2018). En consecuencia, esta disminución de la criosupervivencia espermática afecta la fertilidad de vacas, especialmente después de una inseminación artificial (IA) o fecundación in vitro (FIV) (Amann & Gill, 2000; Rodriguez, 2003).

Las criolesiones celulares están asociadas al choque de frío, estrés oxidativo y la fragmentación del ADN, causados principalmente por el incremento de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Córdova, 2009; Torres, 2013). El mecanismo antioxidante natural de los espermatozoides está determinado por algunos componentes endógenos del plasma seminal como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). Ante la insuficiencia o falla de este mecanismo antioxidante durante la criogenización, se puede provocar una pérdida del potencial de membrana mitocondrial que conlleva a la activación de caspasas, exposición a la fosfatidilserina y al daño del ADN (Aitken et al., 2015). Por lo tanto, el uso de aditivos con efectos antioxidantes es necesario para aminorar este efecto indeseable del estrés oxidativo generado por la criopreservación. Algunos investigadores han estudiado el uso de antioxidantes que permitan el mejoramiento de supervivencia y fertilidad de los espermatozoides congelados y vitrificados (Filipiak et al., 2020; Hernández, 2019; Pasquariello et al., 2020), no obstante; los resultados siguen siendo poco alentadores.

El Resveratrol (RES, trans-3,5,4' trihidroxiestilbeno) es un polifenol que se encuentra en varios tipos de frutas y tiene potentes propiedades antioxidantes, debido a la actividad eliminadora de radicales de este compuesto, lo que da como resultado una reducción en la generación de ROS y, en consecuencia, una reducción de la peroxidación lipídica (LPO) (Fang et al., 2002; Leonard et al., 2003). Su actividad antioxidante ha demostrado resultados promisorios en la criopreservación de espermatozoides de diferentes especies domésticas (Gambini et al., 2015; Gülçin, 2010). Se ha determinado que la actividad antioxidante del RES se debe principalmente, a la eliminación de los radicales libres ( $H_2O_2$ -,  $O_2$ -,  $OH$ -) que se adhieren a la membrana plasmática de los espermatozoides (Leonard et al., 2003).

Se han realizado trabajos previos para mejorar la supervivencia y la capacidad fecundante de los espermatozoides, y se ha demostrado un incremento en la cantidad y calidad de blastocitos después de una fecundación in vitro (FIV) usando semen bovino criopreservado suplementado diferentes niveles de RES (Li et al., 2018). Así mismo, Assunção et al., (2021) suplementó con 50, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  de RES al medio de congelación de esperma bovino y demostró que con 50  $\mu\text{M}$  de RES produce una mayor calidad espermática post-descongelación, no obstante, su capacidad fecundante in vitro no fue mejorada. Por otro lado, las características cinéticas, integridad de membranas, y capacidad fecundante post-descongelación de semen de búfalo fueron mejorados cuando el medio de congelación fue suplementado con RES (Ahmed et al., 2020). El mayor obstáculo de la presente investigación es que no existe información sobre el uso del RES en semen bovino vitrificado.

La FIV es una herramienta que se usa para evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides de diferentes especies domésticas y algunas silvestres. Los espermatozoides, ya sean frescos o criopreservados (congelados o vitrificados) son seleccionados (lavados o centrifugados) y, únicamente la población espermática con mayor integridad y locomoción, son usados para fertilizar a los ovocitos bovinos madurados in vitro (Thys et al., 2009). Por esta razón, nosotros nos planteamos la hipótesis de que la suplementación con RES a los medios de congelación y vitrificación, mejorará la crio-supervivencia y capacidad fecundante de los espermatozoides bovinos sometidos a una FIV bajo condiciones controladas.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de 50  $\mu\text{M}$  de Resveratrol sobre la capacidad fecundante in vitro de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la cinemática espermática de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados con Resveratrol.
- Evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados con Resveratrol sobre la interacción espermatozoides-ovocitos, clivaje y formación de embriones.
- Correlacionar las variables cinéticas de progresividad y el porcentaje de clivaje y blastocistos producidos.

### 1.1.3 Hipótesis

La adición de 50  $\mu\text{M}$  de Resveratrol al medio sintético de congelación (TCG-EY+5% glicerol) y vitrificación (TCG-EY+250  $\mu\text{M}$  sacarosa) mejorará la criopreservación y la capacidad fecundante de espermatozoides bovinos descongelados y calentados.

## Revisión de literatura

### 2.1 Antecedentes a la Fecundación in vitro (FIV)

Los sistemas de fecundación y obtención de embriones in vitro se desarrollan por el avance constante de las biotecnologías, a tal punto que, han permitido obtener descendencia transgénica o multiplicar linaje de alta calidad, estas características dependen principalmente del número de embriones que se pueden llegar a producir, además de la habilidad para lograr su desarrollo hasta una etapa adecuada para ser transferidos a madres receptoras. La investigación en fisiología reproductiva se ha beneficiado significativamente de la fecundación in vitro (FIV) de óvulos de animales sacrificados en mataderos, ya que esto permite obtener una gran fuente de ovocitos a bajo costo, que son la base para la investigación en este campo. La habilidad de madurar y fecundar óvulos in vitro también es útil para generar embriones de vacas que hayan muerto o estén en riesgo de morir y que tengan un alto valor genético. Además, las pruebas de fecundación in vitro tienen el potencial de predecir la fertilidad in vivo (De los Reyes, 1994; First & Parrish, 1987).

#### 2.1.1 Obstáculos en la fecundación

La producción de crías mediante técnicas artificiales es menos efectiva que los procesos naturales, a pesar de que se emplean una serie de pasos que aparentemente son eficaces. En general, solo alrededor del 10% de los ovocitos recuperados resultan viables; además, cuando se tratan ovocitos de vacas inmaduras, extraídos de folículos pequeños con un diámetro de 2 mm, se presenta una limitación adicional, ya que estos ovocitos no pueden adquirir la capacidad necesaria para desarrollarse desde el estado pronuclear hasta convertirse en un blastocisto (Leibfried et al., 1987). Los ovocitos inmaduros pueden adquirir competencia para el crecimiento embrionario cuando se les somete a cocultivo con un gran número de células del cúmulo que han sido estimuladas con FSH, LH y estradiol. La incapacidad de los ovocitos para progresar adecuadamente es una consecuencia de la falta de comprensión sobre los pasos y mecanismos que regulan su maduración. (Staigmilller & Moor, 1984).

#### 2.1.2 Mecanismos que intervienen en la fecundación

La reproducción asistida mediante la técnica de fertilización in vitro implica varios requisitos esenciales: un método de recolección de ovocitos eficiente y no invasivo que no cause daño al ovocito donante, maduración de las células nucleares y citoplasmáticas, así como del complejo cúmulo-ovocito (COC), sistemas de cultivo no dañinos, un método para capacitar a los espermatozoides, sistemas y condiciones efectivas para lograr la fecundación y el desarrollo del embrión desde su obtención hasta una etapa transferible a las receptoras. Cada

paso en este proceso es fundamental para comprender el proceso natural y los mecanismos involucrados (First & Parrish, 1987).

### **2.1.3 Recuperación de ovocitos**

En estudios de investigación, es común extraer los ovarios con los oviductos de una donante después de sacrificarla. Los ovocitos se extraen mediante aspiración de los folículos pre ovulatorios o se enjuagan del oviducto (Brackett et al., 1982; Leibried et al., 1986). Antes de que el cúmulo se expanda, los ovocitos están firmemente unidos en los folículos pequeños y medianos, lo que impide que se puedan aspirar in vivo, a diferencia de lo que ocurre con los folículos pequeños de los ovarios extirpados (Ball et al., 1983). Debido a que muchos folículos en las vacas están en diferentes etapas de atresia, se prefieren ovocitos con células del cúmulo intactas y con citoplasma uniforme. Los ovocitos madurados in vivo pueden ser costosos cuando se necesitan muchos embriones. Por lo tanto, recolectar ovocitos inmaduros de ovarios obtenidos en el matadero puede ser más económico. Es importante tener cuidado con la temperatura, ya que los ovocitos recuperados no pueden madurar más allá de la metafase I si se enfrían por debajo de 30°C (Choudary et al., 1968; Leibfried et al., 1987; Leibried et al., 1986).

## **2.2 Métodos de criopreservación**

En términos generales, existen dos tipos de métodos utilizados para la congelación del semen bovino: el manual y el automatizado. El método manual involucra el uso de un refrigerador y es llevado a cabo por una persona. Por otro lado, el método automatizado utiliza un dispositivo programable que se encarga de realizar todas las etapas de refrigeración y congelación de manera automática. Durante el proceso de congelación en germoplasma animal, utilizando el método manual, se pueden distinguir dos alícuotas; la primera fracción consiste en el semen adicionado con solución diluyente, mientras que la segunda es compuesta por crioprotector intracelular que se agrega a la solución (Vasconcelos, 2010). Existen distintos métodos que han sido creados con el fin de controlar la velocidad de enfriamiento y descongelamiento del semen bovino, los cuales se pueden clasificar en grupos: congelación lenta-descongelación rápida, congelación lenta-descongelación lenta, congelación ultrarrápida o vitrificación. Asimismo, estos métodos pueden ser clasificados según la cantidad de pasos que se utilicen para agregar el crioprotector necesario en el proceso (Boiso, 2001).

### **2.2.1 Congelación convencional**

La técnica de criopreservación conocida como congelación convencional lenta implica un equilibrio entre la velocidad de enfriamiento, la velocidad de deshidratación y la formación de cristales de hielo. Este equilibrio permite controlar la velocidad de enfriamiento al disminuir

gradualmente la temperatura, lo que permite que el crioprotector penetre en la célula y establezca un equilibrio osmótico. Esto disminuye la formación de cristales de hielo intracelulares. La velocidad de enfriamiento necesaria para esta técnica es de 0,2 a 0,3°C por minuto (Guevara & Herrán, 2021).

### **2.2.2 Congelación ultrarrápida (Vitrificación)**

Esta técnica procura la formación de cristales intracelulares y se logra mediante la deshidratación de las mismas. Para ello, se exponen a altas concentraciones de crioprotectores permeables más azúcares que se enfrían rápidamente o de forma ultrarrápida, permitiendo acelerar la eliminación del agua de las células, deshidratándolas rápidamente y facilitando la entrada de los preservantes. De esta manera, las muestras pueden sumergirse directamente en nitrógeno líquido o ser expuestas a vapores de nitrógeno (Taylor, 2020; Vargas & Chacón, 2016).

Este proceso implica diluir el semen en una solución concentrada de un crioprotector no permeable, comúnmente sacarosa (250 mM) (Mohamed, 2015), lo que resulta en una consistencia viscosa que se solidifica sin formar hielo. Al realizar una congelación ultrarrápida de los espermatozoides sumergiéndolos en nitrógeno líquido, el semen adquiere un estado vítreo similar al vidrio (Kuznyetsov et al., 2015; Liebermann et al., 2002). Al disminuir la formación de hielo dentro de las células, que es la principal causa de muerte celular; se logra una mayor tasa de supervivencia después del calentamiento en comparación con la congelación convencional. La vitrificación presenta diversas ventajas, como ser un método sencillo y rápido, así como también más económico que la congelación convencional, no requiere de un medio específico de criopreservación ni de equipamiento especializado, lo que reduce los costos y puede llevarse a cabo en laboratorios convencionales (Horta et al., 2017; Jiménez et al., 2015).

### **2.3 Antioxidantes en la criopreservación**

Son moléculas naturales que evidencian la propiedad de prevenir los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno (ROS), los antioxidantes pueden ser propios del animal denominados endógenos, siendo conformados por enzimas y moléculas presentes en el organismo, entre estas las más conocidas son; el glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SDO), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT), que están presentes tanto en el plasma seminal como en las células espermáticas (Miller et al., 1993). Además, se conoce la existencia de antioxidantes exógenos que son atribuidos al organismo mediante de su consumo en la dieta, entre estos se encuentran la familia de los polifenoles y los

fitoestrógenos presente en una gran variedad de alimentos de origen natural como frutas y vegetales que son consumidos de por diferentes organismos (Coronado et al., 2015).

La criopreservación de espermatozoides es un técnica biotecnológica con alta aceptación en el mundo debido a la posibilidad de un almacenamiento sin tiempo determinado de gran cantidad y variedad de material genético, sin embargo, varios estudios han demostrado que este proceso admite daños criogénicos irreversibles que se manifiestan tanto en las membranas plasmáticas, las mitocondrias y en el ADN, estas lesiones criogénicas son resultado de la formación de cristales de hielo intra y extracelulares, como también del aumento del estrés osmótico y oxidativo en el contenido espermático incorporado al proceso de criopreservación (Arbaiza & Cabrera, 2021; Santiani A. et al., 2012; Stornelli et al., 2005). Estudios realizados por Guillén et al., (2009) han demostrado que este proceso ofrenda daños muy severos tanto en la membrana plasmática, como en la membrana acrosomal, proporcionado en la muestra espermática una disminución en la cantidad y calidad del semen. Los daños atribuidos a la congelación y descongelación pueden afectar la fertilidad, no solo por la gran muerte celular, sino también por la pérdida de funcionalidad del espermatozoide sobreviviente (Flores et al., 2018). Conforme las etapas son culminadas en el proceso de criopreservación la temperatura tiende a llegar a ser cada vez más baja, siendo este el causante preliminar de reducir la actividad y la concentración de antioxidantes endógenos de la muestra seminal conservada criogénicamente (Betancur et al., 2013). El desequilibrio resultante de la gran producción de radicales libre y la disminución de sus sistemas enzimáticos de defensa, favorece la peroxidación de todo compuesto lipídico principalmente presentes en las membranas plasmática, lo que refleja daño o muerte celular repercutiendo en la fertilidad (Ortega et al., 2003).

### **2.3.1 Tipos de Antioxidantes**

Desde hace mucho tiempo se han realizado una gran variedad de estudios e investigaciones con el objetivo de evidenciar el efecto que tiene la adición de antioxidantes en el proceso de criopreservación espermática, lo que ha permitido adquirir gran información sobre si estos pueden o no mejorar los parámetros cinéticos e integridad del espermatozoide, además de poder evidenciar la capacidad fecundante de este semen criopreservado con antioxidantes de cualquier tipo (Cumpa & Marcial, 2009; Flores et al., 2018; Ortega et al., 2003; Villagrán et al., 2019).

#### **2.3.1.1 Alfa-tocoferol**

La vitamina E expresa su actividad como antioxidante biológico ya que previene la oxidación de ácidos grasos polinsaturados y lipoproteínas presentes en la célula. Los tocoferoles y



tocotrienoles poseen la capacidad de transferir un nitrógeno fenólico a un radical peróxido libre de un ácido graso polinsaturado, interrumpiendo la peroxidación de lípidos, además también presenta otros efectos sobre el sistema inmunológico y la apoptosis celular (Jiang, 2014). Investigaciones realizadas en toros cebús por Villagrán et al., (2019) demostró mejorar la funcionalidad y viabilidad de muestras de semen descongeladas, manifestando también un acrosoma intacto cuando se suplemento con 0,5 mM de alfa tocoferol al diluyente base.

#### **2.3.1.2 Ácido ascórbico**

Este antioxidante hidrosoluble sintetizado en el hígado de ciertos animales se encuentra presente en el plasma sanguíneo, mereciendo como principales funciones la de neutralizar radicales libres, reducir el hierro, regenerar la vitamina E y actuar como cofactor enzimático (Villagrán et al., 2019). La vitamina C al presentar una función antioxidante muy notable, ha sido estudiada en varios países en relación a los parámetros de calidad seminal en diferentes animales, según lo reportado por Daramola & Adekunle, (2015), al ser suplementado al diluyente seminal se obtuvo una mejora en los parámetros de calidad, viabilidad, motilidad e integridad acrosomal, además expresó una reducción en el estrés oxidativo resultado de la peroxidación de lípidos. Otras investigaciones del uso del ácido ascórbico y el alta-tocoferol, reflejó que al adicionarlos conjuntamente en el diluyente seminal permite tener una motilidad significativa en relación a su utilización por separado en muestras descongeladas, además en este estudio también reveló mejorar los porcentajes de fertilidad en semen de gallo congelado a 5 °C (Cumpa & Marcial, 2009).

#### **2.3.1.3 Melatonina**

La melatonina en los mamíferos puede ser secretada por varios tejidos, siendo la glándula pineal la mercedora principal de su liberación hacia los diferentes receptores en las células del organismo animal, siendo evidenciado también la presencia de estos receptores en el tracto reproductivo de diferentes especies. Esta hormona debido a varias investigaciones reveló su uso en trastornos inmunológicos, problemas de sueño, en el estrés oxidativo y últimamente en problemas tumorales. (Oviedo & Camejo, 2001). Estudios realizados por Flores et al., (2018) mencionan que la adición de melatonina en la conservación de semen de cerdo permite maximizar la actividad antioxidante de la SOD y su efecto en la lipoperoxidación, dando a relucir su beneficio al ser incorporados en el proceso.

#### **2.3.1.4 Resveratrol (RES)**

El Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), es un potente antioxidante de tipo estilbenoide fenólico extraído de las frutas como la uva, los cacahuates, los arándanos y las moras. Este compuesto es producido por diferentes plantas en defensa a diversas situaciones que

provoquen daños en las mismas. El RES tiene varias funciones sumamente importantes, entre las principales destacan su actividad antioxidante e incremento de la actividad de enzima SIR1, relacionadas a la restricción calórica, además de sus efectos como anticancerígeno, antialérgico, neuroprotector y como promotor de la osteogénesis (Gambini et al., 2015; Li et al., 2012). Este polifenol posee una capacidad limitada al actuar como neutralizante directo de radicales hidroxilo, superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- (Leonard et al., 2003), además, presenta una propiedad mucho más activa en el control de estos ROS como es la inducción de enzimas antioxidantes como el SOD, GPx, CAT, hemooxigenasa 1 y otras, en arterias cultivadas de rata (Ungvari et al., 2007). Este compuesto extraído de vino tinto fomenta un aumento en la actividad transcripcional de SIR1 en células endoteliales que son reacciones que intervienen directamente en la regulación de las enzimas antioxidantes endógenas previniendo así la peroxidación de membranas y daños en el ADN (Li et al., 2012).

Estudios realizados en semen de verraco permitió obtener datos relevantes en relación a la utilización del RES, dado que expresó un aumento significativo en la motilidad post-descongelación, desempeñando un papel sustancial como antioxidante al reducir los índices de radicales libres, mejorando la integridad del acrosoma y de la membrana plasmática. Además, expresó tasas disminuidas de apoptosis inducidas por vías mediadas por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) como también la vía mediada por mitocondrias (He et al., 2020). Los parámetros cinéticos de los espermatozoides son de gran importancia ya que nos permite verificar la calidad de la muestra seminal, al adicionar al proceso algún tipo de aditivo en beneficio de la criosupervivencia espermática; estudios realizados por Assunção et al., (2021), demostraron aumentos en los índices de motilidad progresiva, linealidad y rectitud en semen criopreservado con dosis de 0,05 mM. Al igual que en otro estudio se demostró que a dosis de 0,01 mM, la integridad de la membrana plasmática como del acrosoma mejoraron significativamente (Sharafi et al., 2022).

#### **2.4 Producción in vitro de embriones**

La técnica de producción in vitro de embriones bovinos (PIVE), además de ser una de las técnicas de reproducción asistida más exitosa en las últimas décadas, también ha permitido abrir la posibilidad de utilizarse con fines de investigación para el mejoramiento genético (Wu & Zan, 2012). En los bovinos esta técnica consta de tres procedimientos específicos como son: Maduración in vitro (MIV), Fecundación in vitro (FIV) y Cultivo in vitro de embriones (CIV), los cuales son desarrollados en ambientes asépticos, estériles y en condiciones de temperatura, pH y CO<sub>2</sub> requerido en cada procedimiento (Peláez et al., 2012).

## 2.5 Obtención de COC´S

En la actualidad existen técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas, como la OPU y la laparoscopia, que nos permite obtener ovocitos en animales vivos, sin embargo, también están presentes otras técnicas como la punción folicular que se puede realizar a partir de ovarios de animales post-mortem, estos son una fuente abundante de ovocitos de animales faenados en diversos estados de ciclo estral a un bajo costo, siendo muy utilizado en la área experimental, también se puede obtener ovarios en castraciones que son la forma más higiénica de adquirirlos. Todos estos procedimientos tienen el mismo objetivo que se basa en la recuperación del líquido de folículos entre 3 y 8 mm, para posteriormente obtener gametos inmaduros denominados COC´S, que son la base para el inicio de esta biotecnología reproductiva (Estrella et al., 2017). La calidad de los ovocitos es primordial para una correcta maduración in vitro, por ello la cantidad, calidad y compactación de las células de cumulus alrededor de la célula, como también la homogeneidad de su citoplasma y la integridad de su zona pelúcida son los principales factores a tomar en cuenta, para ello los COC´S se categorizan en base a criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones en cuatro categorías (Calado et al., 2001), siendo las categorías A y B las apropiadas para realizar este procedimiento (Salgado & Lopera, 2020; Tinco et al., 2021).

## 2.6 Maduración in vitro (MIV)

La maduración in vitro es un proceso contiguo a la extracción de los ovocitos inmaduros, en donde los gametos femeninos adquieren la competencia para ser fecundados (Lonergan & Fair, 2008). La presencia de las células de cúmulus, facilitan la asimilación de aminoácidos y otros nutrientes a través de la zona pelúcida, favoreciendo la maduración del ovocito. Se realiza durante 22 a 24 horas en una estufa a 39°C con 5% de CO<sub>2</sub> y máxima humedad relativa. El medio de maduración más exitosamente empleado es el Tissue Culture Medium 199 (TM 199), conformado por sales Earle`s con HEPES y bicarbonato, suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteína siendo utilizada albúmina o suero fetal bovino (SFB), con adición de hormonas como son la LH, FSH, estradiol, todo esto beneficia la expansión de las células de cumulus y la maduración citoplasmática. El 90% de COC´S puestos a madurar son capaces de llegar al estado fisiológicos de los ovocitos cuando son ovulados, siendo capaces de reiniciar la meiosis I y alcanzar el estado de metafase II (Palma, 2001).

## 2.7 Fecundación in vitro (FIV)

Este proceso se lleva a cabo con la unión de ovocitos maduros y de espermatozoides seleccionados y capacitados de muestras frescas, congeladas o vitrificadas. Los espermatozoides antes de entrar en contacto con los ovocitos deben pasar por un proceso

de selección que se lleva a cabo con técnicas como es en gradientes de diferente densidad de percoll puesto a centrifugar o por swim up que tiene su base en la migración de espermatozoides, cuyo objetivo es el de eliminar espermatozoides muertos o no viables, componentes del plasma seminal y crioprotectores permitiendo seleccionar espermatozoides vivos y móviles (Gonella et al., 2013). En la capacitación es importante la adición de heparina al medio en concentraciones óptimas, posterior a esto, se realiza la dilución y conteo de espermatozoides obteniendo un volumen óptimo, precisando de 1 a 6 millones de espermatozoides por grupos de ovocitos cultivados en un medio suplementados con piruvato, lactato y albúmina sérica bovina o SFB, a una temperatura de 39°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo que va de entre 12 a 18 horas (Palma, 2001).

## **2.8 Cultivo in vitro (CIV)**

Esta fase se destaca por permitir a los ovocitos fertilizados alcanzar diferentes etapas de desarrollo embrionario en un tiempo de 1 a 8 días, en este periodo la glucosa es la principal fuente de energía siendo este requerimiento diferente en otras etapas, los aminoácidos juegan un papel importante como es en la síntesis de proteínas, en la actividad antioxidante y en el control sobre el pH que se encuentra entre 7,2 a 7,4, además el ambiente debe presentar una concentración de oxígeno al 5%, de CO<sub>2</sub> al 5% y de Nitrógeno al 90%, que se logra en una estufa trigas, permitiendo además mantener un presión de 40 a 60 mm Hg similar a la de los oviductos bovinos (Fernandes et al., 2007). En este momento se producen una serie de divisiones mitóticas que parte de una gran célula que se denomina cigoto, estas divisiones dan nombre a las diferentes etapas en las que se encuentra el embrión, siendo llamada mórula compacta a una masa sólida en donde sus blastómeros no se diferencian y están muy compactos, posterior a esta fase procede el blastocisto que se diferencia por la presencia principalmente del blastocele y el botón embrionario.

En esta etapa se clasifica la calidad del embrión en base a varios criterios entre estos: la simetría de los blastómeros, la apariencia clara y neta de los mismos, una zona pelúcida (ZP) intacta y sin presencia de defectos visibles. Llegando a ser considerando como G1 o en excelente estado, cuando el embrión presenta todas estas variables subjetivas de calidad, dependiendo de incumplimientos de esto criterios se los sigue clasificando como, G2 bueno, G3 regular y G4 a un blastocisto de pésima calidad que presenta formas irregulares, daño severo en ZP, blastómero desprendidos o presencia de detritos (Salgado & Lopera, 2020).

## Materiales y métodos

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Físicos

- Cámara de Flujo Laminar
- Estufa de CO<sub>2</sub> (Mettler, INC 108, Alemania)
- Estufa triple gas (Mettler, IC050, Alemania)
- Microscopio de contraste de fases y epifluorescencia (Nikon Eclipse Ci-E, contraste de fase negativo [Ph1] con filtro verde; Nikon Instruments, Inc., Nueva York)
- Baño María (Mettler, W350, Alemania)
- Microcentrífuga (Hettich, Mikro 200, Alemania)
- Termo de transporte 2 litros
- Balanza de precisión (Mettler, Bas 31 plus, Alemania)
- Osmómetro (Löser, typ 15, Alemania)
- Dispositivo de calentamiento (STC-3008, de elaboración artesanal, no patentado)
- Platina térmica
- Tubos Falcon de 15 mL
- Papel aluminio
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Puntas y pipetas automáticas de 10, 20, 200 y 1000 µL (Mettler®, Alemania)
- Vasos de precipitación
- Tijeras y pinzas quirúrgicas
- Jeringas 10 mL, 20 mL, 50 mL
- Agujas 18 x 1 ½
- Cajas Petri de plástico 15 mm
- Cajas de búsqueda cuadrículadas
- Cajas NUCK de 5 mm
- Filtros estériles de 0,22 µm y 0,45 µm (NEST, PES Syringe Filters, Nest Scientific USA Inc.)
- Guantes
- Marcador permanente de punta delgada

#### 3.1.2 Biológicos

- Pajuelas de semen bovino congeladas con y sin RES

- Crio-tubos con pellets de semen bovino vitrificados con y sin RES
- Ovarios bovinos provenientes del matadero

### 3.1.3 Reactivos

- Medio de Maduración in vitro (MIV)
- Medio de Fecundación in vitro (FIV-TL-ST- $\mu$ MU)
- Medio de Cultivo in vitro (CIV-CR2)
- Medio de preparación de espermatozoides stock (Sperm- Talp)
- Percoll® (Sigma P1644)
- Nitrógeno líquido y gaseoso
- H-SOFT
- Lactato de Ringer Suplementado con PVA
- Cloruro de sodio (suero)
- Gentamicina 160/2ml

### 3.2 Medios para la Producción in vitro de embriones bovinos (PIVE)

La formulación de los medios de maduración, fecundación y cultivo in vitro usados en este experimento se exponen en las Tablas 1 – 4. Todos los diluyentes y medios se prepararon en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, utilizando productos químicos de grado reactivo adquiridos en Sigma-Aldrich Chemical Co.

**Tabla 1:** Medio MIV (maduración *in vitro*)

Reactivo	Concentración
TCM 199-Earle's salt	-
SFB	10% (v/v)
Piruvato de sodio	0,2 mM
FSH	25 $\mu$ g/mL
LH	5 $\mu$ g/mL
Gentamicina	50 $\mu$ g/mL
L-glutamina	2 mM
Cisteamina	25 $\mu$ M
Estradiol	2 $\mu$ g/mL

**Tabla 2:** Medio FIV (FIV-TL-ST- $\mu$ MU)

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	114 mM
Cloruro de potasio	3,2 mM
Fosfato de sodio monobásico	0,3 mM
DL-Lactato de sodio	10 mM
Cloruro de calcio dihidratado	2 mM
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,5 mM
Bicarbonato de sodio	25 mM
<b>Suplemento de medio FIV</b>	
BSA	6 mg/mL
Piruvato de sodio	0,2 mM
Heparina	20 µg/mL
Gentamicina	50 g/mL

**Tabla 3:** Medio para la preparación de espermatozoides stock (Sperm-Talp)

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	100 mM
Cloruro de potasio	3,2 mM
Fosfato de sodio monobásico	0,3 mM
DL-Lactato de sodio	21,5 mM
Cloruro de calcio dihidratado	2 mM
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,4 mM
HEPES acid free	10 mM
Bicarbonato de sodio	25 mM
<b>Suplemento de medio sperm-talp</b>	
BSA	6 mg/mL
Piruvato de sodio	1 mM
Gentamicina	50 g/mL

**Tabla 4:** Medio de CIV (CIV-CR2)

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	108 mM
Cloruro de potasio	3 mM
Bicarbonato de sodio	25 mM
L-Lactato de calcio hidrato	2,5 mM

Piruvato de sodio	4 mM
BME	X2
MEM	X1
Glutamina	0,02 mM
Estreptomina	0,1 mg/mL
Penicilina	100 U/mL
<b>Suplemento de medio CIV-CR2</b>	
BSA	5 mg/mL
Alanina	1 mM
Glicina	1mM
SFB	3% (v/v)

### 3.3 Diseño experimental

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal ubicado en la Granja Irquis de la Universidad de Cuenca (Latitud: -3.0801834; Longitud: -79.0753254). Este estudio incluyó 4 tratamientos provenientes de semen bovino previamente congelado y vitrificado con 50  $\mu$ M de RES:

- T1: Congelación convencional con RES (CC-RES, n= 80 pajuelas);
- T2: Congelación convencional sin RES (CC-Co control, n=80 pajuelas);
- T3: Vitrificación con RES (VIT-RES, n=20 crio-tubos); y
- T4: Vitrificación sin RES (VIT-Co control, n= 20 crio-tubos).

En una primera etapa, en las muestras descongeladas y calentadas, se evaluó la cinemática mediante el sistema CASA (SCA-Evolution 2018). En una segunda etapa, se evaluó la capacidad fecundante de esos mismos espermatozoides de los cuatro tratamientos mediante una FIV. Se determinó el porcentaje de división celular (Clivaje), porcentaje de blastocitos a los 3 y 7 días post-FIV. Se realizó al menos 8 sesiones de FIV y en cada grupo se fertilizó al menos 200 COC's madurados in vitro. Finalmente, se analizó una correlación entre las variables de progresividad espermática (motilidad progresiva, velocidades rectilínea y curvilínea, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y frecuencia de batida de flagelo) y la producción de embriones producidos por tratamiento.



### 3.4 Metodología

#### 3.4.1 Evaluación de la cinemática

Las pajuelas usadas en este estudio fueron de semen bovino recolectado por vagina artificial, diluido con TCG-YH + 5% de glicerol y congeladas en pajuelas de 0,5 mL. La congelación fue realizada mediante vapores de NL<sub>2</sub> estático colocando las pajuelas equilibradas por 3 horas dentro de una caja de poliestireno con dos rampas en su interior. La caja criogénica contuvo 3,4 L de NL<sub>2</sub> en su interior. La primera rampa estuvo a 17 cm del nivel de NL<sub>2</sub> y las pajuelas fueron expuestas a los vapores de NL<sub>2</sub> durante 4 minutos; consecuentemente, las pajuelas fueron colocadas en la segunda rampa que estuvo a 7 cm del nivel de NL<sub>2</sub> durante 2 minutos; finalmente las pajuelas fueron sumergidas en NL<sub>2</sub> (Tamay et al., 2022).

La descongelación de las pajuelas de 0,50 mL proveniente de los tratamientos 1 y 2 de congelación (CC-RES y CC-Co) fueron realizadas sumergiéndolas en un baño maría a 37°C durante 30 segundos. Posteriormente, las pajuelas fueron secadas, el líquido descongelado fue colocado en un tubo Eppendorf de 1,5 mL; estas muestras fueron incubadas durante 5 minutos antes de la evaluación cinética.

Para el calentamiento de los pellets (30 µL) mantenidos en crio-tubos de 2 mL de los tratamientos 3 y 4 de vitrificación (VIT-RES y VIT-Co) se usaron platinas térmicas atemperadas a 63 – 65°C de un dispositivo de calentamiento artesanal (STC-3008, no patentado). Los pellets se derritieron entre 1 a 2 segundos y el contenido fue recolectado en un vaso de precipitación de 10 mL. Rápidamente, estas muestras fueron trasladadas a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y centrifugadas a 300 gravedades durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en el mismo volumen eliminado con TCG-EY (3.8% Tris [p/v], 2.2% ácido cítrico [p/v], 0.6% glucosa [p/v] + 6% yema de huevo [v/v], pH: 6,9 y osmolaridad: 353 mOsm/kg).

En las muestras descongeladas y calentadas se analizó su cinemática en el sistema computarizado CASA-SCA® (Evolution, 2018, Microptic, Spain). Se registraron los siguientes parámetros según lo detallado por Galarza et al. (2018): motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad promedio (VAP, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, µm), y frecuencia de batida del flagelo (Hz).

### 3.4.2 Evaluación de la capacidad fecundante

Esta evaluación se realizó mediante 8 sesiones de FIV usando ovocitos madurados in vitro provenientes de ovarios bovinos de matadero y las muestras espermáticas de los cuatro tratamientos anteriormente detallados. Los ovarios bovinos fueron recuperados del camal municipal “EMURPLAG” de la ciudad de Cuenca y fueron transportados al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal en suero fisiológico (con gentamicina) a una temperatura entre 35 – 37°C en un lapso menor a 3 horas. La punción folicular, búsqueda y clasificación de ovocitos se realizó en el Laboratorio de Biotecnología. Los ovocitos clasificados como aptos para MIV (COC's con más de 3 capas de células de la granulosa, zona pelúcida intacta y el citoplasma homogéneo) fueron colocados en grupos de 25 COC's en microgotas de 60 µL con medio MIV y puestos a madurar in vitro durante 24 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 6%, una temperatura de 38,5°C y humedad máxima.

Después de 24 horas de incubación, los ovocitos maduros fueron lavados dos veces en medio FIV y fueron transferidos a gotas de 60 µL de mismo medio (FIV-TL-ST-µMU) en grupos de 30 COC's por gota. Los espermatozoides descongelados y calentados de cada tratamiento (200 µL) fueron seleccionados usando en columnas de percoll (400 µL) de 45 y 90% dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 mL y, posteriormente centrifugados en una microcentrífuga a 500 gravedades durante 15 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en 1000 µL de Sperm Talp y centrifugado por segunda vez (lavado) a 300 gravedades durante 5 minutos. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 60 µL de Medio FIV y colocado en la incubadora de CO<sub>2</sub> durante al menos 30 minutos antes de la FIV. La concentración fue evaluada y cada muestra fue calculada para inseminar cada gota de 60 µL con los ovocitos maduros con un volumen final para alcanzar una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Los gametos (espermatozoides y óvulos) se incubaron conjuntamente a 38,5°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en aire con humedad máxima (92%). Al menos 200 ovocitos madurados in vitro fueron inseminados con cada tratamiento en las 8 sesiones de FIV. Al tercer día, los presuntos zigotos de cada gota y cada tratamiento fueron colocados en un tubo Falcon de 15 mL que contenía 2 mL de PBS atemperado a 38,5°C y fueron agitados en un vórtex a máxima potencia durante 3 minutos. Este procedimiento se realizó para eliminar las células de la granulosa y que los presuntos zigotos queden únicamente con su zona pelúcida. Los zigotos fueron reunidos nuevamente en conjuntos de 25 y colocados en gotas de 30 µL con medio CIV; previamente en estas placas de 35 mm se cubrió las gotas con 3 mL de aceite mineral. Estas placas fueron incubadas durante 8 días en una cámara triple gas (CO<sub>2</sub> 6%, Nitrógeno 5% y O<sub>2</sub>) a 38,5°C y una humedad máxima. La tasa de división

celular (clivaje) y la tasa de blastocistos producidos se evaluó a los 3 y 8 días post FIV, respectivamente.

### **3.4.3 Correlación entre variables espermáticas de progresividad y fertilidad**

Las variables cinemáticas tales como MT, MP, VCL, VSL, ALH y BCF fueron correlacionadas con la tasa de clivaje y la tasa de blastocistos (al día 8) en cada tratamiento para determinar el grado de relación entre estas variables.

### **3.5 Análisis estadísticos**

Los datos fueron analizados en el software STATISTICA para Windows versión 12,0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Las variables de salida (cinemática y fertilidad) se sometieron a la prueba de Shapiro Wilk para determinar la distribución normal; aquellas variables que no siguieron una distribución normal fueron transformadas a Arcoseno (variables porcentuales) o Log-10 (variables numéricas) previo a los análisis estadísticos. Un ANOVA (diseño completamente al azar) unidireccional y la prueba post Hoc de Tukey fueron usados para evaluar el efecto de los tratamientos con y sin RES en muestras descongeladas y calentadas sobre la cinemática y capacidad fecundante. Además, una prueba de correlación de Pearson se usó para evaluar la correlación entre las variables de progresividad, las tasas de clivaje y de blastocistos. El nivel de significancia fue  $P < 0,05$ .

## Resultados

### 3.1 Cinemática espermática

Los valores correspondientes a las variables cinemáticas de los cuatro tratamientos según el tipo de criopreservación (congelación y vitrificación) y la suplementación o no de Resveratrol (50  $\mu$ M RES y 0  $\mu$ M RES) se exponen en la Tabla 5.

En general, los valores de motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), velocidades (VCL, VAP y VSL), y frecuencia de batida de flagelo (BCF) fueron superiores ( $P < 0,05$ ) en las muestras congeladas y descongeladas (CC-RES y CC-Co) que en aquellas muestras vitrificadas y calentadas (VIT-RES y VIT-Co).

Después de la criopreservación, el tratamiento CC-RES produjo mayores porcentajes de MT y MP que aquellos tratamientos CC-Co ( $P < 0,05$ ), VIT-Res ( $P < 0,05$ ) y VIT-Co ( $P < 0,05$ ). Los tratamientos de congelación con (CC-RES) y sin RES (CC-Co) produjeron porcentajes más altos ( $P < 0,05$ ) de STR comparado con el tratamiento VIT-Co, sin embargo, el tratamiento de vitrificación con RES (VIT-RES) alcanzó porcentajes similares a todos los otros tratamientos (CC-RES, CC-Co y VIT-Co). Por otro lado, el tratamiento de congelación con RES (CC-RES) produjo valores superiores ( $P < 0,05$ ) de LIN y ALH que aquellos tratamientos de vitrificación, independientemente del RES (VIT-RES y VIT-Co). Finalmente, el tratamiento de vitrificación con RES (VIT-RES) produjo un valor más alto ( $P < 0,05$ ) de BCF que su contraparte control (VIT-Co).

**Tabla 5:** Valores de las variables cinemáticas de muestras espermáticas de bovinos congelados o vitrificados con Resveratrol

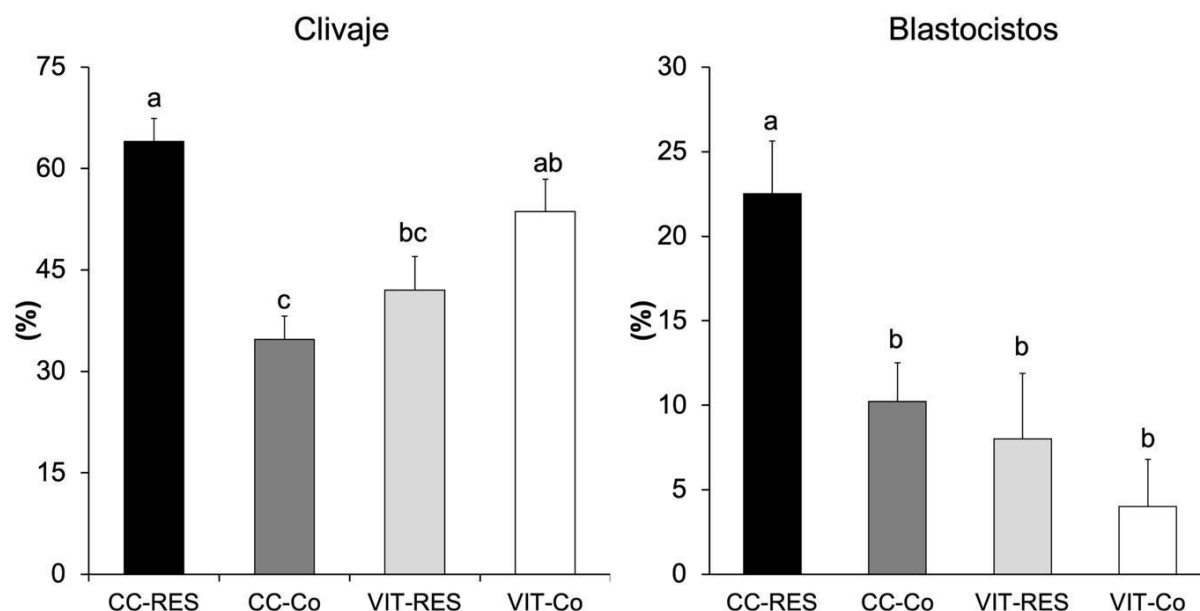
Variables cinemáticas	Tratamientos			
	Congeladas-descongeladas		Vitrificadas-calentadas	
	CC-RES	CC-Co	VIT-RES	VIT-Co
MT (%)	59,6 $\pm$ 2,21 <sup>a</sup>	49,3 $\pm$ 1,97 <sup>b</sup>	8,0 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	7,5 $\pm$ 0,54 <sup>c</sup>
MP (%)	35,1 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup>	28,0 $\pm$ 1,73 <sup>b</sup>	2,0 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	1,8 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>
VCL ( $\mu$ m/s)	69,1 $\pm$ 1,69 <sup>a</sup>	63,5 $\pm$ 1,64 <sup>a</sup>	54,3 $\pm$ 2,37 <sup>b</sup>	49,3 $\pm$ 2,15 <sup>b</sup>
VAP ( $\mu$ m/s)	39,9 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>	36,3 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	29,5 $\pm$ 1,34 <sup>b</sup>	25,8 $\pm$ 1,13 <sup>b</sup>
VSL ( $\mu$ m/s)	31,0 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	28,1 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>	22,3 $\pm$ 1,25 <sup>b</sup>	19,3 $\pm$ 1,31 <sup>b</sup>
STR (%)	70,4 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	69,4 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	67,2 $\pm$ 1,09 <sup>ab</sup>	64,0 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>
LIN (%)	42,4 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	41,5 $\pm$ 0,83 <sup>ab</sup>	38,5 $\pm$ 1,10 <sup>bc</sup>	36,7 $\pm$ 1,00 <sup>c</sup>
WOB (%)	57,5 $\pm$ 0,70	57,1 $\pm$ 0,65	58,3 $\pm$ 1,10	54,9 $\pm$ 0,96

<b>ALH (µm)</b>	2,8 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,06 <sup>ab</sup>	2,5 ± 0,08 <sup>bc</sup>	2,4 ± 0,07 <sup>c</sup>
<b>BCF (Hz)</b>	8,9 ± 0,23 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,22 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,30 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,21 <sup>c</sup>

Diferentes superíndices en cada fila expresan diferencias significativas entre tratamientos (<sup>a-b-c</sup> P, 0,05; <sup>a-c</sup> P < 0,01). **MT**, motilidad total; **MP** motilidad progresiva; **VCL**, velocidad curvilínea; **VAP**, velocidad promedio; **VSL**, velocidad rectilínea; **LIN**, linealidad; **STR**, rectitud; **WOB**, oscilación; **ALH**, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (**ALH**, µm); y **BCF** frecuencia de batida del flagelo.

### 3.1 Capacidad fecundante

El tratamiento CC-RES produjo una tasa de división celular (equivalente al clivaje) más alta (P < 0,05) que los tratamientos CC-Co y VIT-RES (64,0 ± 3,40 % frente a 34,7 ± 3,44 %; 42,0 ± 4,96 %). Notablemente, el tratamiento VIT-Co produjo una tasa de clivaje superior (P < 0,05) al tratamiento CC-Co. Sin embargo, después de 8 días de incubación en cultivo celular, el tratamiento CC-RES produjo un porcentaje de blastocistos más alto (P < 0,05) que los tratamientos CC-Co, VIT-RES y VIT-Co (22,5 ± 3,11 % frente a 10,2 ± 2,29 %; 8,0 ± 3,88 %; y 4,0 ± 2,8 %, respectivamente).



**Figura 1:** Tasa de división celular (clivaje) y de producción de blastocistos. Letras diferentes en cada barra y cada parámetro expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b).

### 4.3 Correlación entre cinemática y fertilidad

En la Tabla 6 se muestra la correlación de las variables de progresividad y las variables de fertilidad in vitro expresada en la capacidad que tuvieron los espermatozoides bovinos congelados y vitrificados con o sin Resveratrol para fecundar ovocitos, dividirse en células (clivaje) y formar embriones (blastocistos).

Los tratamientos de congelación mostraron una correlación ( $P < 0,01$ ) entre la MT y los porcentajes de clivaje y blastocistos formados. Además, el tratamiento de congelación con Resveratrol (CC-RES) mostró una baja correlación ( $P < 0,05$ ) entre los valores de MP y ALH y el porcentaje de clivaje. Por otro lado, el tratamiento de congelación sin Resveratrol (CC-Co) mostró una baja correlación ( $P < 0,05$ ) entre el valor de VSL y el porcentaje de blastocistos. Finalmente, el tratamiento de vitrificación sin Resveratrol (VIT-Co) mostró una correlación ( $P < 0,01$ ) entre el valor de VSL y el porcentaje de clivaje (Tabla 6).

**Tabla 6:** Correlación entre variables cinéticas de progresividad y de fertilidad in vitro (clivaje y de blastocistos).

Variables	Tratamientos								
	CC-RES		CC-Co		VIT-RES		VIT-Co		
	Clivaje (%)	Blastocistos (%)	Clivaje (%)	Blastocistos (%)	Clivaje (%)	Blastocistos (%)	Clivaje (%)	Blastocistos (%)	
MT	r	0,335	0,340	0,327	0,120	0,158	0,149	0,098	0,048
	P	0,002	0,001	0,003	0,290	0,273	0,300	0,497	0,741
MP	r	0,288	0,199	0,189	0,061	0,120	0,115	0,048	0,106
	P	0,007	0,046	0,093	0,592	0,408	0,426	0,741	0,465
VCL	r	0,1309	0,068	0,0356	0,107	0,201	0,002	0,268	0,024
	P	0,230	0,532	0,754	0,346	0,163	0,990	0,060	0,868
VSL	r	0,062	0,033	0,103	0,286	0,101	0,100	0,376	0,030
	P	0,570	0,765	0,366	0,010	0,485	0,488	0,007	0,834
ALH	r	0,229	0,093	0,216	0,094	0,257	0,008	0,011	0,012
	P	0,034	0,396	0,055	0,406	0,072	0,954	0,938	0,934
BCF	r	0,040	0,138	0,157	0,188	0,040	0,006	0,060	0,159
	P	0,714	0,205	0,165	0,095	0,782	0,968	0,677	0,269

Valor 'r', grado de correlación entre variable cinemática progresiva y de fertilidad por tratamiento; valor 'P', grado de significación ( $P < 0,05$ ) según la prueba de correlación de Pearson.

### Discusión

Los resultados de la presente investigación demostraron que la suplementación con Resveratrol al medio de congelación ejerció un efecto crioprotector debido al incremento de la MT y MP, y la fertilidad in vitro expresada en el incremento del porcentaje de división celular (clivaje) y desarrollo embrionario (blastocistos). Además, se evidenció una correlación positiva entre motilidades y tasas de clivaje y blastocistos en muestras congeladas con Resveratrol. Sin embargo, el Resveratrol adicionado al medio de vitrificación incrementó únicamente la BCF. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la acción antioxidante y crioprotectora del Resveratrol influyó positivamente durante el proceso de congelación, mientras que, en la vitrificación, su efecto fue limitado.

En los procesos de criopreservación las células tienden a sufrir daños estructurales y funcionales ligados principalmente al estrés oxidativo debido a la producción excesiva de las ROS junto con una disminución de los factores antioxidantes endógenos propios de la célula, provocando una reducción de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante. Previamente, se ha estudiado el efecto del RES y se ha determinado su rol antioxidante y crioprotector debido a la protección que brinda a espermatozoides de bovinos, caprinos, aves y verracos tras el proceso criogénico (Assunção et al., 2021; Lv et al., 2019; Rezaie et al., 2021; Sharafi et al., 2022; Zhu et al., 2019). El RES (10 o 50  $\mu\text{M}$ ) fue suplementado a un diluyente comercial y tras la congelación y descongelación se evidenció una mejora en las motilidades total y progresiva, integridad de la membrana, acrosoma y la actividad mitocondrial (Chunrong et al., 2019). La misma crio-respuesta celular fue evidenciada en espermatozoides porcinos (He et al., 2020) y bovinos (Bucak et al., 2015; Assunção et al., 2021; Sharafi et al., 2022) luego de la suplementación con 10 a 100  $\mu\text{M}$  de RES al medio de congelación.

Se ha determinado varios mecanismos antioxidantes y crioprotectores por el cual actúa este compuesto. El RES elimina directamente radicales libres como los  $\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2^-$  o metales pesados (Fang et al., 2002) inhibiendo o disminuyendo la LPO en las membranas plasmáticas de los espermatozoides (Leonard et al., 2003; H. Li et al., 2012). Investigaciones previas han demostrado estos beneficios en la criopreservación de espermatozoides. La suplementación con 50  $\mu\text{M}$  de RES al diluyente seminal determinó una disminución significativa de la LPO y el daño oxidativo en el semen porcino criopreservado; este beneficio antioxidante se atribuyó a la modulación de enzimas endógenas como SOD y CAT (Zhu et al., 2019). La activación y modulación de estas enzimas por acción del RES indicaron una mediación con los radicales libres disminuyendo así el estrés oxidativo y peroxidación de membranas celulares (Grujić et al., 2022; Ungvari et al., 2007). Rezaie et al., (2021) indicaron que la adición de diferentes dosis de RES atenuó los niveles de malondialdehído (MDA) uno de los marcadores de LPO



en los espermatozoides después de la congelación. La reducción del MDA es indicativo de una reducción de las ROS que conlleva a aminorar la LPO mejorando la integridad de las membranas celulares.

Por otro lado, se ha determinado que el RES aumentó los niveles de fosforilación de AMPK en espermatozoides de gallo disminuyendo los radicales libres y mejorando las variables cinemáticas (Martin et al., 2018). La activación de AMPK por efecto del RES se debe a la regulación de la energía celular espermática, estimulando las vías catabólicas e inhibiendo las anabólicas (Rezaie et al., 2021; Price et al., 2012). Zhu et al., (2019) suplementaron con 50  $\mu$ M de RES en semen de jabalí descongelado y determinaron un aumento de la fosforilación de AMPK, lo que redujo la producción de radicales libres y fortaleció el mecanismo de defensas enzimáticas de los espermatozoides, mejorando la integridad de las membranas y sus características cinéticas. Todos estos mecanismos son los responsables de los diferentes hallazgos criogénicos encontrados en investigaciones de muestras espermáticas criopreservadas en diferentes especies, que repercuten positivamente en la motilidad, viabilidad, integridad de membranas y en su capacidad fecundante. Los resultados obtenidos en la presente investigación son consistentes con todos los resultados de los trabajos antes mencionados. Aunque se determinó un efecto individual, nuestros resultados demostraron que el RES mejoró los parámetros cinéticos de esperma bovino criopreservado tales como las MT y MP, no obstante, en el semen vitrificado solo mejoró la BCF. Esta investigación constituye el primer reporte de la suplementación con RES en la vitrificación de semen bovino.

La FIV es utilizada a menudo en laboratorios para determinar la capacidad fecundante y fertilidad de espermatozoides sometidos a criopreservación (Garcez et al., 2010); sin embargo, este proceso no siempre es consistente con la fertilidad in vivo lograda después de una IA (O'meara et al., 2005, 2008). En la fertilización interviene otros factores que influyen en la capacidad cinética que tienen los espermatozoides para interactuar con los ovocitos, penetrarlos y fecundarlos; para lograr estos resultados, los espermatozoides criopreservados deben estar intactos en estructura y función para alcanzar un exitoso desarrollo embrionario (Filipiak, 2021).

La criopreservación de espermatozoides congelado con 50  $\mu$ M de RES y su efecto sobre la capacidad fecundante se ha determinado en búfalos, demostrando una mayor capacidad de penetración de espermatozoides a ovocitos (Longobardi et al., 2017). Un estudio reciente desarrollado por Assunção et al., (2021) demostraron que a pesar de que 50  $\mu$ M de RES mejoró las variables cinéticas, integridad de membrana y ADN después de la congelación, no



presentaron ningún efecto en el porcentaje de clivaje ( $71,8 \pm 3,1$  % vs.  $67,8 \pm 3,5$  %) o desarrollo embrionario de blastocistos ( $28,6 \pm 1,9$  % vs.  $27,5 \pm 2,8$  %). Los resultados obtenidos en este estudio, contrariamente, demostraron un efecto significativo de  $50 \mu\text{M}$  de RES suplementado el medio de congelación sobre la tasa de clivaje ( $64,0 \pm 3,40$  % vs.  $34,7 \pm 3,44$  %) y desarrollo embrionario de blastocistos ( $22,5 \pm 3,11$  % vs.  $10,2 \pm 2,29$  %) en comparación con sus controles. Si bien, la concentración de RES ( $50 \mu\text{M}$ ) y los diluyentes TCG-YH usados en ambos estudios fueron similares existen diferencias desde la obtención del semen eyaculado. Mientras que Assunção et al., (2021) recogieron el semen mediante electro eyaculación, congelaron el semen con 6% de glicerol en pajuelas de 0,25 mL y usaron un sistema convencional de congelación de una sola rampa a 5 cm por encima del nivel de NL2, esta investigación usó pajuelas de 0,5 mL provenientes de semen eyaculado (vagina artificial) y previamente congeladas con un 5% (v/v) de glicerol bajo un sistema de doble rampa de congelamiento (Tamay et al., 2022).

Al usar una menor cantidad de glicerol disminuye la osmolaridad de medio de congelación y las células podrían deshidratarse con menor daño (Woelders, 1997). Además, se ha demostrado que el sistema de congelación de doble rampa detallado por Tamay et al., (2022) produjo velocidades de enfriamiento por aceleración, y consecuentemente se ha demostrado que este mecanismo de enfriamiento produce mayor supervivencia espermática comparado con los sistemas convencionales de una sola rampa a 5 cm del nivel de NL2 (Galarza et al., 2019a; 2019b; Woelders & Chaveiro, 2004). Además, se ha reportado diferencias en la congelabilidad de eyaculados obtenidos mediante vagina artificial y electro eyaculación (Argudo et al., 2019). Nosotros creemos que las pajuelas congeladas bajo las condiciones descritas anteriormente, mejoraron la crio-respuesta espermática y, en consecuencia, los espermatozoides lograron una mayor capacidad para fecundar los ovocitos durante la FIV y alcanzar un mejor desarrollo embrionario expresado en tasas de clivaje y de blastocistos.

El mejoramiento de las condiciones de fecundación in vitro ha demostrado que el RES puede influir en una mejor capacidad fecundante y su desarrollo embrionario. La suplementación del lavado de espermatozoides y los medios de fertilización in vitro con  $100 \mu\text{M}$  de RES produjo menores concentraciones de ROS en espermatozoides y un mayor desarrollo embrionario hasta las etapas de clivaje y blastocistos cuando se utilizó semen sexado de toro (Li et al., 2018). Esto sugiere que el RES puede conducir a una mejora en la fertilidad cuando se agrega este compuesto al medio de fertilización in vitro. En concordancia con este estudio y a pesar de que en la presente investigación no se suplementó el medio FIV con RES, demuestra que el uso de este aditivo antioxidante puede mejorar los sistemas de producción in vitro. Por otro lado, este efecto no fue evidenciado en el semen vitrificado debido a que durante este método

de criopreservación, un gran porcentaje de espermatozoides sufrieron daños de membrana, lesiones estructurales y disminución de la cinética. Estos efectos decreméntales, probablemente condujeron a una baja tasa de división celular y, consecuentemente, un bajo desarrollo embrionario. Estudios anteriores demuestran mayores criolesiones en espermatozoides sometidos a congelación ultrarrápida o vitrificación que espermatozoides congelados convencionalmente (Baiee et al., 2020; Galarza et al., 2021; Pradiee et al., 2017).

La relación entre los resultados de los parámetros del sistema CASA y la fertilidad (in vitro o in vivo) del semen ha sido ampliamente estudiada en el toro (Yániz et al., 2018). Las correlaciones entre los parámetros de CASA y la fertilidad oscilan entre una correlación muy baja hasta una muy alta ( $r = 0,9$ ). Budworth et al., (1988) encontraron que las mediciones del movimiento de los espermatozoides (motilidades y velocidades) estuvo altamente correlacionada con la fertilidad después de la IA. Gliozzi et al., (2017) determinaron que los parámetros cinemáticos tales como MT, células activas, BCF, VCL y ALH de toros estuvo relacionado con la fertilidad in vitro de espermatozoides bovinos. La adición de RES al medio de congelación mostró una correlación entre la MT, MP y ALH y la fertilidad basada en una tasa de clivaje o desarrollo embrionario (blastocistos).

### Conclusiones

- Esta investigación concluye que la suplementación con Resveratrol al medio de congelación incrementó las características cinéticas de motilidad (MT, MP), velocidad (VCL, VAP, VSL) y batida espermática en las muestras congeladas con y sin RES.
- El incremento en las características cinéticas en las muestras congeladas con y sin RES, contrario a las muestras vitrificadas con y sin RES, están relacionadas con la capacidad fecundante, así como con la fertilidad in vitro según el aumento de tasa de clivaje y blastocistos producidos.
- Se evidenció una correlación positiva entre las variables cinética espermática y capacidad fecundante. Sin embargo, el Resveratrol adicionado al medio de vitrificación incrementó únicamente la frecuencia de batida de flagelo de los espermatozoides calentados.

### Referencias

- Ahmed, H., Jahan, S., Ullah, H., Ullah, F., & Salman, M. M. (2020). The addition of resveratrol in tris citric acid extender ameliorates post-thaw quality parameters, antioxidant enzymes levels, and fertilizing capability of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*, *152*, 106–113.
- Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., & Gharagozloo, P. (2015). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*(2), 1–10. <https://doi.org/10.1071/RD15325>
- Amann, R. P., & Gill, S. P. S. (2000). Correlation or diagnosis and prediction. *Proc. 14th ICAR, Stockholm*, *1*(69), 2.
- Arbaiza Barnechea, M. D., & Cabrera Villanueva, P. C. (2021). Efecto de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN, viabilidad, y parámetros cinéticos en toros Brown Swiss. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, *13*(1), e787. <https://doi.org/10.24188/recia.v13.n1.2021.787>
- Argudo, D. E., Galarza, D. A., Bueno, P., Iñiguez, C. U., Méndez, S., Soria, M. E., Torres, C. S., Perea, F. P., & Alberio, R. H. (2019). Methods of collection, extender type, and freezability of semen collected from creole bulls raised in the tropical highlands of Ecuador. *Tropical Animal Health and Production*, *51*, 1839–1845.
- Assunção, C. M., Mendes, V. R. A., Brandão, F. Z., Batista, R. I. T. P., Souza, E. D., Carvalho, B. C. de, Quintão, C. C. R., Raposo, N. R. B., & Camargo, L. S. A. (2021). Effects of resveratrol in bull semen extender on post-thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*, *226*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106697>
- Baiee, F., Al-Wahab, B. A., Almusawi, A. A., Yu, L. L., Fitri, W.-N., & Bustani, G. S. (2020). Effect of vitrification on spermatozoa quality in bull semen. *EurAsian Journal of BioSciences*, *14*(2), 3897–3904.
- Ball, G. D., Leibfried, M. L., Lenz, R. W., Ax, R. L., Bavister, B. D., & First, N. L. (1983). Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction*, *28*(3), 717–725.
- Betancur, G. R., López, E. P., & Rojano, B. A. (2013). Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. *Revista Lasallista de Investigación*, *9*(1), 128–136.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de crio-biología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, *18*(4), 20–22.
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., & Dressel, M. A.

- (1982). Desarrollo normal tras la fecundación in vitro en la vaca. *Biology of Reproduction*, 27(1), 147–158.
- Bucak, M. N., Ataman, M. B., Başpınar, N., Uysal, O., Taşpınar, M., Bilgili, A., Öztürk, C., Güngör, Ş., Inanc, M. E., & Akal, E. (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 47(5), 545–552.
- Budworth, P. R., Amann, R. P., & Chapman, P. L. (1988). Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *Journal of Andrology*, 9(1), 41–54.
- Calado, A. M., Rocha, E., Colaço, A., & Sousa, M. (2001). Stereologic characterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from small antral follicles during the diestrous phase. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1383–1391.
- Choudary, J. B., Gier, H. T., & Marion, G. B. (1968). Cyclic changes in bovine vesicular follicles. *Journal of Animal Science*, 27(2), 468–471.
- Chunrong, L., Larbi, A., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. *Animal Reproduction Science*, 208, 106127. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106127>
- Córdova Izquierdo, A. C. J. (2009). Oxidative stress and antioxidants in the spermatid conservation. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 1–38.
- Coronado, M., Vega, S., Gutierrez, T., & Radilla, V. (2015). Antioxidants: Present perspective for the human health. *Revista Chilena de Nutricion*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Cumpa, G., & Marcial, J. (2009). Evaluación comparativa del ácido ascórbico y del tocoferol sobre la fertilidad de semen de gallo. *Anales Científicos*, 70(1), 27–33. <https://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/acu/article/view/68/67>
- Daramola, J. O., & Adekunle, E. O. (2015). Cryosurvival of goat spermatozoa in Tris-egg yolk extender supplemented with vitamin C. *Archivos de Zootecnia*, 64(247), 261–268. <https://doi.org/10.21071/az.v64i247.402>
- De los Reyes, M. (1994). Fecundación in vitro en bovinos: Avances en el manejo de gamentos. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 9(1).
- Estrella, C., Suconota, G., & Ayala, L. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *Maskana*, 8, 101–103.
- Fang, J., Lu, M., Chen, Z., Zhu, H., Li, Y., Yang, L., Wu, L., & Liu, Z. (2002). Antioxidant effects

- of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chemistry—A European Journal*, 8(18), 4191–4198.
- Fernandes, A., Diaz, T., & Muñoz, G. (2007). In vitro Production of Bovine Embryos - A Review. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(9), 51–60. <https://doi.org/10.5713/ajas.2001.1342>
- Filipiak Neumark, Y. (2021). *Calidad y capacidad fertilizante in vitro de semen de toros criollo uruguayo criopreservado en dos diluyentes comerciales y análisis de variabilidad genética*.
- Filipiak, Y., Armstrong, E., Aragunde, R., Fila, D., Laureiro, J. A. G., Alvarez, V., Pereira, M., Boggio, J. C., Larocca, C., & Vila, F. (2020). Calidad y capacidad fertilizante in vitro de semen de toros Criollo Uruguayo criopreservado en dos diluyentes comerciales. *Latin American Archives of Animal Production*, 28(3–4), 133–143.
- First, N. L., & Parrish, J. J. (1987). Fecundación in vitro de rumiantes. *J. Reprod. Fertil*, 34, 151–165.
- Flores, C., Meléndez, C., Mendoza, C., Márquez, Y., & Vilanova, L. T. (2018). Antioxidant effect of the melatonin during the conservation of boar semen. *Revista Veterinaria*, 29(1), 13. <https://doi.org/10.30972/vet.2912780>
- Galarza, D. A., Landi, G., Mejía, E., Samaniego, J. X., Méndez, S., Soria, M. E., Taboada, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2021). Cryopreservation of dog epididymal spermatozoa by conventional freezing or ultra rapid freezing with nonpermeable cryoprotectant. *Cryobiology*, 103, 15–21.
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2019a). Effectiveness of two-step accelerating cooling rate on post-thaw characteristics of ram sperm. *Reproduction in domestic animals*, 54, 113.
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2019b). Two step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*, 91, 84–89.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., & Borrás, C. (2015). Propiedades del resveratrol: estudios in vitro e in vivo sobre metabolismo, biodisponibilidad y efectos biológicos en modelos animales y humanos. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 837042. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>
- Garcez, M. E., dos Santos Branco, C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F., & Salvador, M. (2010). Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen.

- Fertility and Sterility*, 94(6), 2118–2121.
- Gliozzi, T. M., Turri, F., Manes, S., Cassinelli, C., & Pizzi, F. (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 11(11), 1975–1982.
- Gonella, A., Atuesta, J., Bernal, S., & Chacón, L. (2013). Overview of the production of bovine embryos in vitro. *Investigación Agraria y Ambienta*, 4(1), 65–80.
- Grujić Milanović, J., Jačević, V., Miloradović, Z., Milanović, S. D., Jovović, D., Ivanov, M., Karanović, D., Vajić, U. J., & Mihailović-Stanojević, N. (2022). Resveratrol improved kidney function and structure in malignantly hypertensive rats by restoration of antioxidant capacity and nitric oxide bioavailability. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154, 113642. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113642>
- Guevara Lozano, P. M., & Herrán Barrero, G. A. (2021). *Criopreservación de gametos y embriones en animales domésticos*.
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210–218. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002>
- He, W. hua, Zhai, X. hu, Duan, X. jun, & Di, H. shuang. (2020). Effect of resveratrol treatment on apoptosis and apoptotic pathways during boar semen freezing. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 21(6), 485–494. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900520>
- Hernández Barriga, Y. C. (2019). *Crio-preservación y viabilidad espermática de semen de bovinos charolais post-descongelación con diferentes concentraciones de trehalosa*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Horta, F., Alzobi, H., Jitanantawittaya, S., Catt, S., Chen, P., Pangestu, M., & Temple-Smith, P. (2017). Minimal volume vitrification of epididymal spermatozoa results in successful invitro fertilization and embryo development in mice. *Asian Journal of Andrology*, 19(1), 107.
- Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant and anti inflammatory activities and the role in disease prevention and therapy. *Free Radicc Biol Med*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035.Natural>
- Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., del Olmo, E., Fernández-Santos, R., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2015). Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71(1), 85–90.
- Kuznyetsov, V., Moskovtsev, S. I., Crowe, M., Lulat, A. G.-M., & Librach, C. L. (2015).



- Vitrification of a small number of spermatozoa in normozoospermic and severely oligozoospermic samples. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(1), 13–17.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., Northey, D. L., & First, N. L. (1987). Potencial de desarrollo de ovocitos bovinos madurados in vitro o in vivo. *Biology of Reproduction*, 36(2), 376–383. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.2.376>
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., Northey, D. L., & First, N. L. (1986). Potencial de desarrollo de los ovocitos bovinos madurados in vitro o in vivo. *Theriogenology*, 25(1), 164.
- Leonard, S. S., Xia, C., Jiang, B.-H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G. K., & Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(4), 1017–1026.
- Li, C., Zhao, Y., Hao, H., Wang, H., Huang, J., Yan, C., Du, W., Pang, Y., Zhang, P., & Liu, Y. (2018). Resveratrol significantly improves the fertilisation capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting apoptosis and lipid peroxidation. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.
- Li, H., Xia, N., & Förstermann, U. (2012). Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* (Vol. 26, Issue 2, pp. 102–110). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.12.006>
- Liebermann, J., Nawroth, F., Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G., & Tucker, M. J. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1671–1680.
- Lonergan, P., & Fair, T. (2008). In vitro produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology*, 69(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>
- Longobardi, V., Zullo, G., Salzano, A., De Canditiis, C., Cammarano, A., De Luise, L., Puzio, M. V., Neglia, G., & Gasparrini, B. (2017). Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*, 88, 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.046>
- Martin-Hidalgo, D., de Llera, A. H., Calle-Guisado, V., Gonzalez-Fernandez, L., Garcia-Marin, L., & Bragado, M. J. (2018). AMPK Function in Mammalian Spermatozoa. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 3293, 19(11), 3293. <https://doi.org/10.3390/IJMS19113293>
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebozinska, E., & Madsen, F. C. (1993). Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2812–2823. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77620-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77620-1)



- Mohamed, M. S. A. (2015). Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(10), 633.
- O'meara, C. M., Hanrahan, J. P., Donovan, A., Fair, S., Rizos, D., Wade, M., Boland, M. P., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2005). Relationship between in vitro fertilisation of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 64(8), 1797–1808.
- O'meara, C. M., Hanrahan, J. P., Prathalingam, N. S., Owen, J. S., Donovan, A., Fair, S., Ward, F., Wade, M., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2008). Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 69(4), 513–522.
- Ortega, A. M., Izquierdo, A. C., José, J., Gómez, H., Olivares-corichi, M., Manuel, V., Torres, M., & Valencia, D. J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación. *Interciencia*, 28(12), 1–16.
- Oviedo, N. J., & Camejo, M. I. (2001). La Melatonina: ¿Un Posible Agente Terapéutico? *Interciencia*, 26(3), 103–107.
- Palma, G. (2001). *Producción in vitro de embriones bovinos* (Primera Ed). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Pasquariello, R., Verdile, N., Brevini, T. A. L., Gandolfi, F., Boiti, C., Zerani, M., & Maranesi, M. (2020). The Role of Resveratrol in Mammalian Reproduction. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194554>
- Peláez Gutiérrez, J., Urribarrí Rodríguez, Y., Pirela Pirela, A., Báez Contreras, F., Villamediana Monreal, P., & Hernández Fonseca, H. (2012). Influencia de la predominancia racial sobre la competencia de maduración, fecundación y desarrollo in vitro de ovocitos bovinos. *Revista de La Universidad Del Zulia*, 3(5), 21–42.
- Pradiee, J., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Lopez-Sebastián, A., Guerra, R., & Santiago-Moreno, J. (2017). Conventional slow freezing cryopreserves mouflon spermatozoa better than vitrification. *Andrologia*, 49(3), e12629.
- Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J. Y., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B. J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J. S., Hubbard, B. P., Varela, A. T., Davis, J. G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A. P., Coppari, R., Palmeira, C. M., Sinclair, D. A. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism*, 15(5), 675–690. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.003>

- Rezaie, F. S., Hezavehei, M., Sharafi, M., & Shahverdi, A. (2021). Improving the post-thaw quality of rooster semen using the extender supplemented with resveratrol. *Poultry Science*, *100*(9), 101290. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101290>
- Rodriguez-Martinez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: ¿still utopía? *Reproduction in Domestic Animals*, *38*(4), 312–318.
- Rubio-Guillen, J. L., Quintero-Moreno, A. A., & Villalobos, D. M. G. (2009). Effect of Cryopreservation on Integrity of Plasmatic and Acrosomal Membrane of Bulls Sperm. *Revista Científica-Facultad De Ciencias Veterinarias*, *19*(4), 382–389.
- Salgado-Cruz, E., & Lopera-Vásquez, R. (2020). Essential aspects on in vitro fertilization techniques in cattle. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *31*(3), 1–14. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I3.17138>
- Santiani A., A., Evangelista V., S., Cheuquemán A., C., Von Baer H., A., Risopatrón G., J., & Sánchez G., R. (2012). Evaluación de la integridad de ADN mediante citometría de flujo en espermatozoides de alpaca criopreservados con análogos de superóxido dismutasa. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *23*(2), 182–191. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.898>
- Sharafi, M., Blondin, P., Vincent, P., Anzar, M., & Benson, J. D. (2022). Hydroxytyrosol and resveratrol improves kinetic and flow cytometric parameters of cryopreserved bull semen with low cryotolerance. *Animal Reproduction Science*, *245*(August), 107065. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107065>
- Skidmore, J. A., Malo, C. M., Crichton, E. G., Morrell, J. M., & Pukazhenthil, B. S. (2018). An update on semen collection, preservation and artificial insemination in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Animal Reproduction Science*, *194*(December 2017), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.013>
- Staigmiller, R. B., & Moor, R. M. (1984). Efecto de las células foliculares sobre la maduración y competencia de desarrollo de ovocitos ovinos madurados fuera del folículo. *Gamete Research*, *9*(2), 221–229.
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., & Savignone, C. a. (2005). Criopreservation Effect on Fertility. *Analecta Veterinaria*, *25*(2), 28–35.
- Tamay, E., Palacios, P., Peláez, G., Saa, L. R., Dorado, J., Santiago-Moreno, J., & Galarza, D. A. (2022). Effect of Melatonin and Caffeine Supplementation to Freezing Medium on Cryosurvival of Peruvian Paso Horse Sperm Using a Two-Step Accelerating Cooling Rate. *Biopreservation and Biobanking*.
- Taylor Robinson, A. W. (2020). Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos by

- vitrification: in pursuit of a simplified, standardized procedure that improves pregnancy rates to promote cattle industry use. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 36(3), 251–270. Thys, M., Vandaele, L., Morrell, J. M., Mestach, J., Van Soom, A., Hoogewijs, M., & Rodriguez-Martinez, H. (2009). In vitro Fertilizing Capacity of Frozen-thawed Bull Spermatozoa Selected by Single-layer (Glycidoxypropyltrimethoxysilane) Silane coated Silica Colloidal Centrifugation. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 390–394.
- Tinco-Salcedo, J., Quispe-Gutiérrez, U., & Zea-Gonzales, D. (2021). Asociación entre calidad de ovocitos recuperados y condición corporal en vacas criollas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 23(3), 133–138.
- Torres, M. T. (2013). Calidad de la producción seminal en futuros sementales Holstein, relación con el desarrollo testicular. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 14(1), 1–22.
- Ungvari, Z., Orosz, Z., Rivera, A., Labinsky, N., Xiangmin, Z., Olson, S., Podlutzky, A., & Csiszar, A. (2007). Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 292(5), 2417–2424. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01258.2006>
- Vargas Reyes, J. N., & Chacón Jaramillo, L. (2016). Cryopreservation method and composition of the vitrification solution affect viability of in vitro bovine embryos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 29(2), 130–137.
- Vasconcelos Filho, W. F. de. (2010). *Eficacia de la congelación automatizada sobre la viabilidad del semen bovino*.
- Villagrán, M., Muñoz, M., Díaz, F., Troncoso, C., Celis-Morales, C., & Mardones, L. (2019). Vitamin C in health and disease: A current perspective. *Revista Chilena de Nutricion*, 46(6), 800–808. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182019000600800>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60, 481–492.
- Woelders, H. (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19(3), 135–138.
- Woelders, H., & Chaveiro, A. (2004). Theoretical prediction of optimal freezing programmes. *Cryobiology*, 49(3), 258–271.
- Wu, B., & Zan, L. (2012). Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(5), 865–871. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01945.x>

Yániz, J. L., Silvestre, M. A., Santolaria, P., & Soler, C. (2018). CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 799–809.

Zhu, Z., Li, R., Fan, X., Lv, Y., Zheng, Y., Hoque, S. A. M., Wu, D., & Zeng, W. (2019). Resveratrol Improves Boar Sperm Quality via 5' AMP-Activated Protein Kinase Activation during Cryopreservation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5921503>

## Anexos

*Anexo A: Entrega de termo al camal y preparación previa a la recepción en el laboratorio.*



*Anexo B: Desempaque y lavado de ovarios*

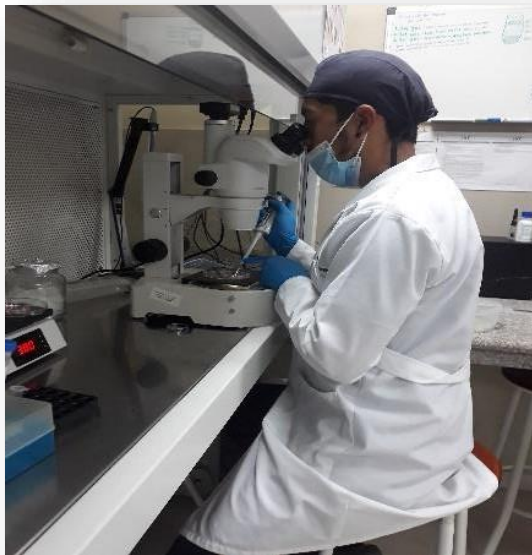




*Anexo C: Punción folicular, búsqueda y clasificación de COC's*



*Anexo D: MIV (Día -1)*



## Anexo E: FIV (Día 0)



## Anexo F: Descongelación de pajuelas y calentamiento de pellets

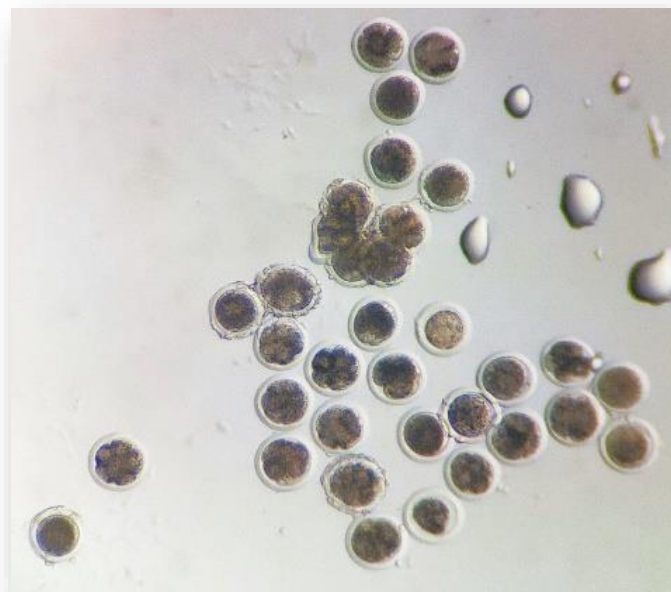




*Anexo G: CIV (Día 1)*



*Anexo H: Clivaje al 3er día (presuntos cigotos)*





*Anexo I: Blastocistos (8vo día)*

