

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación del Knockout™ Serum Replacement en la producción de embriones, y expresión del gen *Aquaporina 3* en blastocistos bovinos producidos *in vitro* post-congelación

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


Autores:

Diana Gabriela Peña Campoverde

Sofía Belén Vera López

Director:

María Silvana Méndez Álvarez

ORCID:  0000-0001-5139-717

Cuenca, Ecuador

2024-03-27

Resumen

Esta investigación determinó el efecto del Knockout™ Serum Replacement (KSR) en la producción de embriones, y expresión del gen *Aquaporina3* en blastocistos bovinos producidos *in vitro* post-congelación. Los complejos cúmulo-ovocito fueron madurados y fecundados *in vitro*, los embriones fueron incubados por 6 días en medio de cultivo suplementado con 3 tratamientos: 5 % del KSR, 5 % de suero fetal bovino (SFB), o 0,6 % de albúmina sérica bovina (CON). En el día 7, luego de la FIV, los embriones fueron clasificados según su morfología. Los blastocistos de calidad 1 fueron congelados y almacenados en Nitrógeno líquido. Posterior a ser descongelados se extrajo el ARN total, se sintetizó el ADN complementario y se cuantificó la expresión del gen de Aquaporina 3 mediante RT-qPCR. Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza, las medias comparadas con la prueba de los mínimos cuadrados. En la tasa de clivaje hubo similitud entre tratamientos, la proporción de embriones totales osciló entre: 24,9 a 26,3 %; para blastocistos entre 20,1 al 21,3 %, y para embriones tempranos: 31,1 al 40,4 %. Los tratamientos KSR y SFB obtuvieron una tasa mayor de embriones regulares, que el CON; esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). El grupo CON obtuvo el mayor porcentaje de embriones avanzados (45,9 %) y mayor número de blastocistos re-expandidos (7,6 %) después de la descongelación e incubación por 24 horas en comparación con los otros tratamientos. En cuanto a la expresión de Aquaporina3 no hubo diferencia significativa en el análisis entre tratamientos.

Palabras clave: reproducción bovina, expresión genética, cultivo embrionario, reproducción *in-vitro*



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 determined the effect of Knockout™ Serum Replacement (KSR) on embryo production, and expression of the Aquaporin3 gene in bovine blastocysts produced in vitro post-freezing. The cumulus-oocyte complexes were matured and fertilized in vitro, the embryos were incubated for 6 days in culture medium supplemented with 3 treatments: 5% KSR, 5% fetal bovine serum (FBS), or 0.6% albumin bovine serum (CON). On day 7, after IVF, the embryos were classified according to their morphology. Quality 1 blastocysts were frozen and stored in liquid nitrogen. After being thawed, the total RNA was extracted, the complementary DNA was synthesized and the expression of the Aquaporin 3 gene was quantified by RT-qPCR. The data were processed using analysis of variance, the means compared with the least squares test. In the cleavage rate there was similarity between treatments, the proportion of total embryos ranged between: 24.9 to 26.3%; for blastocysts between 20.1 to 21.3%, and for early embryos: 31.1 to 40.4%. The KSR and SFB treatments obtained a higher rate of regular embryos than the CON; This difference was statistically significant ($p < 0.01$). The CON group obtained the highest percentage of advanced embryos (45.9%) and the highest number of re-expanded blastocysts (7.6%) after thawing and incubation for 24 hours compared to the other treatments. Regarding the expression of Aquaporin3, there was no significant difference in the analysis between treatments.

Keywords: bovine reproduction, genetic expression, embryonic culture, in-vitro reproduction



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

Resumen	2
Abstract	2
Agradecimientos	8
Dedicatoria	9
Introducción	11
Objetivo General	14
Objetivos específicos	14
1. Analizar el efecto de la suplementación del medio de cultivo con Knockout™ Serum Replacement en la producción de embriones bovinos <i>in vitro</i>	14
2. Analizar el efecto de la suplementación del medio de cultivo con Knockout™ Serum Replacement mediante la expresión del gen Aquaporina 3 en blastocistos bovinos producidos <i>in vitro post-congelación</i>	14
Hipótesis	14
Revisión de literatura	15
Producción <i>in vitro</i> de embriones	15
Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	15
Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	16
Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	17
Fuentes de proteínas en los cultivos <i>in vitro</i> (CIV)	18
Criopreservación de embriones	21
Supervivencia embrionaria <i>post-congelación</i>	22
Expresión de genes relacionados con el desarrollo del embrión	24
<i>Aquaporina (AQP)</i>	25
<i>Transportador de Glucosa 3 (GLUT3)</i>	25
<i>Conexina 43 (Cx43)</i>	26
<i>Interferón tau (IFN-t)</i>	27
<i>Esfingosina-1-fosfato fosfatasa 1 (SGPP1)</i>	27
<i>Bcl-2 Associated X-protein (BAX)</i>	28
<i>La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)</i>	28
Materiales y Métodos	29
Materiales	29
Procedimiento	30
<i>Localización de la investigación</i>	30

UCUENCA

5

<i>Medios utilizados</i>	32
<i>Recolección de ovarios</i>	34
<i>Obtención de ovocitos</i>	34
<i>Evaluación y clasificación de COC's</i>	34
<i>Maduración de ovocitos</i>	35
<i>Fecundación in vitro</i>	35
<i>Cultivo in vitro y asignación de tratamientos</i>	35
<i>Congelación de blastocistos</i>	36
<i>Incubación de blastocistos luego la descongelación</i>	37
<i>Extracción de ARN</i>	37
<i>Síntesis de ADN complementario (cDNA)</i>	37
<i>Determinación génica</i>	37
<i>Análisis estadístico</i>	38
Resultados.....	40
Conclusiones	46
Referencias	47
Anexos	55

Índice de figuras

Figura 1. Localización del laboratorio Singamia en la ciudad de Cuenca	29
Figura 2. Localización del laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Veterinaria de la Universidad de Saint George, Granada	29
Figura 3. Localización del laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Cuenca	30
Figura 4. Expresión del gen de acuaporina 3 en blastocistos post-congelación.....	44

Índice de tablas

Tabla 1. Análisis bioquímico del suero de novillo y fetal bovino de dos lotes distintos (CanSera International Inc. y Bocknek Lab). Adaptado de Palasz (1996) y Tornesi y Archer (1993).	18
Tabla 2. Composición del producto sintético KnockOut™ Serum Replacement (las concentraciones no fueron especificadas).	18
Tabla 3. Materiales que se utilizaron en el estudio.	27
Tabla 4. Composición del medio de maduración <i>in vitro</i>	30
Tabla 5. Composición del medio de fecundación <i>in vitro</i> (FERT-TALP)	30
Tabla 6. Composición del medio de cultivo <i>in vitro</i> (SOF-CIT)	31
Tabla 7. Composición del medio HEPES-fluido oviductal sintético (hSOF)	31
Tabla 8. Expresión génica TaqMan®	35
Tabla 9. Efecto del Knockout Serum Replacement o del suero fetal bovino sobre el número promedio de cigotos clivados y en las diferentes categorías de embriones producidos	37
Tabla 10. Efecto del Knockout Serum Replacement o del Suero Fetal Bovino sobre la reexpansión de blastocistos a las 24 horas luego de la descongelación.	38

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a Dios por habernos guiado y otorgado la fortaleza necesaria para alcanzar nuestro objetivo científico, así como a nuestras familias y amigos por su invaluable apoyo y sabios consejos a lo largo de este camino.

Extendemos nuestro más sincero reconocimiento a la Dra. Silvana Méndez, nuestra directora de tesis, cuya dedicación y orientación fueron fundamentales para el logro de este hito académico. Asimismo, deseamos expresar nuestra gratitud hacia el Dr. Fernando Perea, el Dr. Daniel Argudo y el Dr. Antonio Vallecillo, cuya experiencia y sabiduría han contribuido de manera significativa a nuestra investigación, y cuyos consejos y enseñanzas llevaremos con nosotros en nuestra trayectoria profesional.

También deseamos agradecer al Dr. Hugo Hernández-Fonseca, la Dra. Bhumika Sharma y el Dr. Andy Alhassan de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Saint George (SGU), Granada, por su invaluable ayuda en el procesamiento de las muestras de ADNc para este trabajo de titulación. Su experiencia ha contribuido de manera fundamental al éxito de esta investigación. Esta fase de la investigación recibió apoyo financiero parcial a través de la Iniciativa de Pequeñas Subvenciones para Investigación (SRGI 23004) de la Iniciativa de Investigación de la Isla de Barlovento (WINDREF-SGU).

Por último, expresamos nuestro sincero agradecimiento a todos los docentes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, por impartirnos los conocimientos necesarios con dedicación y pasión, permitiéndonos así, alcanzar esta meta académica.

Diana & Sofía

Dedicatoria

Este trabajo de titulación se le dedico a Dios y a mis padres Jesús y María, por ser el pilar fundamental en mi vida para poder culminar con esta meta tan anhelada, por su amor incondicional y sus consejos de vida para convertirme en una gran mujer y profesional.

A mis hermanos Jessica, Alex y Saúl por alentarme día a día para no desistir y seguir adelante, por su amor y cariño. Por creer en mí.

A mis abuelitas Esther y Teresa quienes estuvieron al pendiente de mí y de mi bienestar con sus oraciones, inculcándome valores para ser una mujer de bien.

A mi tío José quien a la distancia siempre estuvo apoyándome y aconsejándome.

A mi compañero de vida Christian por su amor y apoyo durante todo este camino.

A mi amiga y compañera de tesis Sofía con quien hemos compartido buenos y malos momentos en el transcurso de la vida universitaria, que gracias a su apoyo y dedicación hemos logrado culminar con este trabajo.

A mis amigas que ahora son colegas veterinarias quienes, con sus consejos, apoyo incondicional logramos cumplir este sueño.

A mis familiares que de una u otra forma estuvieron alentándome a cumplir con este sueño.

Diana Gabriela Peña Campoverde.

Dedicatoria

Esta investigación que es el resultado final de muchos años de esfuerzo quiero dedicárselo principalmente a mis padres Klever y Sandra, a mis hermanas Ruth y Romina quienes fueron pilar fundamental para poder iniciar y terminar este largo camino. Quienes con su constante e invaluable apoyo a través de los años desde diferentes aspectos me apoyaron para finalmente poder culminar con el inicio de mi formación académica.

A mi abuelo Octavio del cual siempre obtuve palabras de aliento.

También quiero agradecer a mi querida mascota Quinnie quien me acompañó en toda mi infancia y etapa adulta, por ser la principal motivación para iniciar esta hermosa carrera.

Finalmente quiero dedicar un profundo agradecimiento a Diana mi amiga y compañera de tesis. Juntas hemos recorrido este largo camino lleno de alegrías y altibajos.

Sofía Belén Vera López.

Introducción

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es una de las biotécnicas de reproducción asistida más usada en las últimas décadas sobre todo en la especie bovina. Se pueden obtener complejos cúmulo ovocito (COCs) de vacas vivas o de ovarios de matadero, en el último caso, con la finalidad de producir embriones a gran escala con fines de investigación (Mermillod, 2011). La PIVE con ovarios de matadero permite obtener información con respecto a las interacciones que ocurren de forma natural entre los gametos femeninos, el oviducto y el útero.

Actualmente la PIVE se mantiene por debajo del 40 % a pesar de que el 90 % de los ovocitos madurados *in vitro* alcanzan la metafase II, y de éstos un 80 % logran clivar (al menos a estadios de 2 células). Luego de la fecundación *in vitro* (FIV), sólo entre 30 y 40 % de estos ovocitos llegan al estadio de blastocistos al sexto día de cultivo (Lonergan *et al.*, 2006). Muchos factores influyen la PIVE, algunos propios de la donadora de ovocitos (estado nutricional y de salud, estadio del ciclo estral, raza, etc.), y otros a las condiciones del medio ambiente que precede la colecta de ovocitos; no obstante, las condiciones *in vitro* en las que los ovocitos son madurados, fecundados y cultivados, son determinantes para una PIVE exitosa (Rizos *et al.*, 2002).

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos representan aportes de gran importancia para la ciencia, la medicina veterinaria e industria (Jochems *et al.*, 2002). El uso del SFB en el medio de cultivo ha permitido grandes aportes en la PIVE, pero su uso en los sistemas *in vitro* se ha empezado a cuestionar (Van der Valk *et al.*, 2004). Debido al desconocimiento de la composición de SFB, se introducen variables desconocidas en el sistema de cultivo, además, que podría contaminarse con virus, micoplasma y priones lo cual afectaría la reproducibilidad experimental (Eloit, 1999). Sin embargo, la adición de SFB al medio de cultivo es importante ya que aporta factores hormonales que estimulan la proliferación celular, proteínas de transporte, factores estabilizadores y desintoxicante requeridos para mantener el pH (Van der Valk *et al.*, 2004).

El uso de SFB es cuestionado por varias razones, en primer lugar, la recolección de suero causa un sufrimiento innecesario al ternero por nacer, en segundo lugar, los cambios estacionales y continentales en la composición del suero producen variaciones de lote a lote; lo cual provoca diferencias en los cultivos celulares dando como efecto

variaciones en los resultados (Van der Valk *et al.*, 2004). En tercer lugar, el SFB estimula la producción de embriones; sin embargo, cuando éstos son criopreservados (congelados o vitrificados) su viabilidad disminuye considerablemente luego que se descongelan o desvitrifican, en comparación con los embriones frescos (no criopreservados) (Rizos *et al.*, 2003; Muci *et al.*, 2006b).

Algunas investigaciones indican que la adición de SFB al medio de cultivo estimula la acumulación de lípidos en el citoplasma embrionario, lo cual afecta la criotolerancia de los embriones luego de la congelación o vitrificación, reflejándose en un menor porcentaje de re-expansión y de eclosión de los blastocistos, así como también con un menor número de blastómeras viables y mayor tasa de apoptosis celular (Mucci *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2003; Sudano *et al.*, 2012)

Generalmente el medio de cultivo se complementa con suero o BSA, pero estas son mezclas indefinidas de sustancias que resultan en tasa de desarrollo muy variables (Menezo *et al.*, 2000). Para evitar este problema y estandarizar los medios de cultivo, es necesario reemplazar los componentes desconocidos por cantidades exactas de macromoléculas sintéticas (Bavister, 1995); es decir, buscar sustitutos del SFB con una composición conocida de sustancias. El Knockout™ Serum Replacement (KSR) fue patentado en 1998 como un sustituto del SFB en los cultivos de células madre (Price *et al.*, 1998). Ha sido usado en el mantenimiento de células madre embrionarias, el establecimiento de líneas celulares, congelación de células y como medio de manipulación para la inyección de células madre embrionarias en blastocistos (Sakurai *et al.*, 2015).

Sakurai *et al.* (2015) en su estudio, notificaron que la adición de 5 % de KSR al medio de cultivo aumentó significativamente la tasa de eclosión de blastocistos el día 7 y el número total de células en blastocistos eclosionados parcial y totalmente los días 6 y 7 luego de la FIV. Además, la adición de KSR incrementó la calidad del blastocisto, determinándose mediante el contenido de ATP y la expresión de ARNm.

Una forma importante de evaluar la viabilidad de los embriones *post* congelación es mediante la expresión de los genes asociados con su capacidad de desarrollo. Es así que la expresión de ARNs mensajeros codifican proteínas que promueven el desarrollo normal de los embriones. Por ejemplo, la Connexina 43 (Cx43) es una proteína que participa en la formación de uniones tipo *gap* en las células de los

embriones en estadios previos a la implantación (Mucci *et al.*, 2006). Las acuaporinas (AQP) están involucradas en la formación del blastocele en la embriogénesis de mamíferos, por lo cual la expresión de isoformas particulares de AQP son necesarias para la formación de blastocistos (Nishimoto *et al.*, 2006).

Por lo descrito anteriormente, en los últimos años han adquirido especial relevancia la utilización de medios químicamente definidos, por lo que el suero sintético KnockOut™ Serum Replacement (KSR) podría ser una excelente alternativa para proveer una fuente conocida de proteínas y otras sustancias beneficiosas para el embrión. Sin embargo, es escasa la información en bovinos que haya demostrado la efectividad de este producto en la PIVE y posterior viabilidad luego de la criopreservación.

Objetivo General

Evaluar el efecto del Knockout™ Serum Replacement en el medio de cultivo mediante la producción de embriones y la expresión del gen Aquaporina 3 en blastocistos bovinos producidos *in vitro post-congelación*.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la suplementación del medio de cultivo con Knockout™ Serum Replacement en la producción de embriones bovinos *in vitro*.
2. Analizar el efecto de la suplementación del medio de cultivo con Knockout™ Serum Replacement mediante la expresión del gen Aquaporina 3 en blastocistos bovinos producidos *in vitro post-congelación*.

Hipótesis

La suplementación del medio de cultivo con Knockout™ Serum Replacement incrementa la expresión del gen Aquaporina 3 asociado con la supervivencia y desarrollo embrionario en blastocistos bovinos *post-congelación*.

Revisión de literatura

Producción *in vitro* de embriones

La PIVE se ha convertido en una tecnología muy útil con objetivos específicos en la mejora genética del ganado bovino. La combinación de la PIVE con otras biotécnicas es ampliamente utilizada en América del Norte, América del Sur y Europa. A pesar de los continuos esfuerzos para mejorar la eficiencia en la producción *in vitro* de blastocistos, su rendimiento sigue bajo y la proporción de ovocitos que alcanzan el estadio de blastocisto ronda entre el 30 al 40 %, que es la mitad del rendimiento que se obtiene al combinar la estimulación ovárica con la fecundación *in vivo*. Además, los blastocistos producidos *in vitro* parecen ser de menor calidad que los producidos *in vivo* (Martínez *et al.*, 2019).

Los ovocitos para PIVE se pueden obtener mediante: 1) aspiración folicular guiada por ultrasonido de animales vivos o por ovariectomía o 2) aspiración folicular *post mortem* (ovarios derivados de matadero). Los ovocitos se aspiran de un grupo heterogéneo de folículos antrales, de 2 a 8 mm de tamaño, incluidos grupos provenientes de ondas foliculares no ovulatorias y ovulatorias. Los ovocitos en los grandes folículos dominantes estarán en el proceso de pre-maduración o capacitación, desarrollando su competencia para la maduración final, la fertilización y así sostener el desarrollo embrionario (Hyttel *et al.*, 1997).

Maduración *in vitro* (MIV)

Los sistemas de maduración *in vitro* (MIV) deben garantizar que el ovocito resultante complete normalmente su desarrollo y sea capaz de ser fecundado dando origen a un cigoto que luego de algunos días se haga un embrión competente que logre continuar su desarrollo luego de la transferencia (Parrish, 2014)

Varios factores afectan la MIV de los ovocitos bovinos como: el tiempo de transporte y la temperatura del ovario que los contienen desde el matadero hasta el laboratorio, el tamaño del folículo, la etapa de desarrollo del ovocito, el diámetro del ovocito, composición de medios, hormonas y suero (Park *et al.*, 2005)

El período inapropiado de la maduración podría conducir a la formación anormal de cromatina, degeneración de los ovocitos y disminución del desarrollo (Marston & Chang, 1964)

La maduración nuclear del ovocito consiste en la progresión de la meiosis desde la profase de la primera división meiótica hasta la metafase de la segunda división meiótica (MII) en el momento de la ovulación. Los ovocitos normalmente completarán la maduración nuclear, es decir, alcanzarán la MII dentro de 20 a 24 horas, y luego estarán listos para la fertilización que es cuando completan la meiosis y se forma los pronúcleos (Zárate, 2006).

Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios para lograr entornos parecidos a los que tienen los embriones en el oviducto y útero, involucran el uso de medios de cultivo tales como el TCM – 199 suplementado con hormonas (LH, FSH, Estradiol, etc.) antioxidantes (Glutación, Cisteamina, Cistina), factores de crecimiento y macromoléculas (SFB y Albúmina), en una atmósfera del 5 % CO₂ a 38,5° C y humedad a saturación (Trasorras & Giuliano, 2013)

Fecundación *in vitro* (FIV)

La FIV consiste en exponer los ovocitos maduros a los espermatozoides que ya han sido capacitados o están en proceso de capacitación. La extracción de ovocitos bovinos poco antes de la FIV es necesaria para realizar procedimientos invasivos de sexado de embriones y técnicas de micromanipulación, como la transferencia nuclear y la inyección de espermatozoides, para estudiar las interacciones entre gametos masculinos y femeninos y para evaluar aspectos morfológicos de la calidad de los ovocitos, como la identificación de cuerpos polares, granulación y vacuolización del ooplasma, y extensión del espacio perivitelino (Katska *et al.*, 1989).

La presencia del cúmulo oóforo durante la FIV bovina tiene un efecto negativo o nulo sobre la penetración de los espermatozoides. Este estudio proporcionó evidencia de que el cúmulo oóforo beneficia la capacidad de fertilización de los espermatozoides penetrantes al crear un microambiente complejo de secreciones y productos metabólicos alrededor del ovocito. La comunicación de unión entre el ovocito y las células de la corona, así como la captura de espermatozoides por el cúmulo oóforo,

parecen ser factores esenciales para apoyar la fertilización (Younis & Brackett, 1991; Chian *et al.*, 1995)

Los espermatozoides capacitados han sufrido modificaciones bioquímicas que les permiten reaccionar acrosómicamente al exponerse a la zona pelúcida, células del cúmulo u otras sustancias asociadas con ovocitos madurados *in vitro* (Tanghe *et al.*, 2003).

Cultivo *in vitro* (CIV)

Los medios CIV son soluciones de compuestos orgánicos e inorgánicos formuladas con características biofísicas particulares, para proveer todas las sustancias y condiciones que requiere el embrión en los diferentes estadios de desarrollo hasta blastocisto (Mucci *et al.*, 2006).

El cultivo *in vitro* de los presuntos cigotos se inicia a las 24 horas *post-FIV*, estas estructuras deben ser lavadas varias veces para remover el medio FIV y los espermatozoides suspendidos en él. La tasa de fecundación es determinada a las 48 horas *post-FIV*, cuantificando la proporción de estructuras clivadas (Palma, 2001)

El uso de medios de cultivo definidos permite evaluar las condiciones nutricionales necesarias para el desarrollo de embriones a estadios óptimos para su transferencia. El diseño de estos medios se basa en la dinámica fisiológica y metabólica del embrión y en la reducción del estrés intracelular. Sin embargo, un medio indefinido dificulta el examen de los requerimientos nutricionales de los embriones y contribuye a la variabilidad en la composición del sistema de cultivo. Además, los componentes presentes en el medio de cultivo pueden competir con los embriones por los nutrientes o los desechos metabólicos pueden tener un efecto nocivo en el desarrollo del embrión. (Trasorras *et al.*, 2013).

Varios autores (Menezo & Khatchadourian, 1991; Palasz, 1996) coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario se describen a continuación.

Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que la osmolaridad óptima sería 280 ± 20 mOsm/Kg. El pH debe oscilar entre

7,2 y 7,6. La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5 % CO₂ en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5 % O₂, 90 % N₂ y 5 % CO₂ para el desarrollo embrionario.

El fluido oviductal se caracteriza por bajos niveles de sodio y altos niveles de potasio, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: Magnesio, Calcio, Bicarbonato, Sulfatos y Fosfatos.

El agua es el componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario (Marquant-Leguienne & Humblot, 1998). La mayor resistencia ofrecida es 18,3 megaOhms-cm a 25 °C.

Elementos orgánicos: en la actualidad existe una gran cantidad de información con relación al efecto de ciertas hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares sobre el desarrollo embrionario. No obstante, la fuente de energía y fuente de proteínas son componentes constantes en las formulaciones finales de los medios de cultivo utilizados en la PIVE (Mucci *et al.*, 2006).

Fuentes de proteínas en los cultivos *in vitro* (CIV)

Albúmina sérica bovina

La albúmina sérica bovina (BSA) es una proteína altamente ligadora de lípidos que capta ácidos grasos y Colesterol de las membranas celulares y las desestabiliza, además, interviene en el transporte de determinadas sustancias a través de la membrana. La importancia del papel de la albúmina queda demostrada por la variación de los resultados de desarrollo embrionario que se obtienen en función de su pureza (Izquierdo *et al.*, 1995).

La BSA mejora el desarrollo embrionario, la formación de blastocistos y las tasas de eclosión *in vitro*. Puede tener una función nutricional al proporcionar aminoácidos después de la hidrólisis proteica, manteniendo así las reservas de aminoácidos intracelulares. También puede proporcionar compuestos embriotróficos aún no definidos (p. ej., Citrato, Esteroides) que pueden funcionar como quelante de iones de metales

pesados y captador de radicales libres; además, protegen los constituyentes celulares contra el efecto de las toxinas, regulan el potencial redox, el pH, la osmolaridad y es esencial para la capacitación y la reacción del acrosoma *in vitro* (Orsi & Leese, 2004).

Suero fetal bovino

El suero fetal bovino (SFB) posee una mezcla compleja y contiene un gran número de sustancias que incluyen Glucosa, proteínas, vitaminas, oligoelementos, hormonas y factores de crecimiento (Valk et al., 2010).

Muchos de estos factores son esenciales e indispensables para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo de las células. Además, se han determinado concentraciones de Albúmina y Globulinas superiores en un 85 % en comparación al suero de un bovino adulto (Mucci *et al.*, 2006). En relación a los factores de crecimiento, se ha descrito la presencia del factor de crecimiento transformante (Transforming growth factor; TGF) y Factor de crecimiento similar a insulina 1 (Insulin-like growth factor 1; IGF-I) (Mucci *et al.*, 2006).

Estos factores ejercen su efecto mediante la unión a receptores específicos Tirosina-quinasa ubicados en la membrana celular, iniciando reacciones en cascada que culminan con la fosforilación de factores de transcripción que regulan la expresión génica (Mucci *et al.*, 2006). Se deduce que los sustratos oxidables como el Piruvato y ciertos aminoácidos son los preferidos en el medio de cultivo de embriones durante el desarrollo *in vitro* (Tompson & Partridge, 1996).

Tabla 1. Análisis bioquímico del suero de novillo y fetal bovino de dos lotes distintos (CanSera International Inc. y Bocknek Lab). Adaptado de Palasz, (1996) y Tornesi & Archer, (1993)

Determinación	Suero de novillo		Suero fetal bovino	
	CanSera Int.	Bocknek Lab.	CanSera Int.	Bocknek Lab.

Albumina g/l	36	34	19	19
Globulina g/l	36	37	19	19
Urea mM	3,6	2,9	6,3	6,3
Glucosa mM	1,3	0,8	7	7
Potasio mM	6,3	5	3,44	13,6
Sodio mM	140	140	135	135
Fósforo mM	1,87	2,24	3,44	3,44
Calcio mM	2,45	2,45	3,72	3,72

KnockOut™ Serum Replacement

El KSR tiene una composición constante de un lote a otro, es una mezcla de pequeñas moléculas orgánicas (aminoácidos, vitaminas y antioxidantes), oligoelementos y tres proteínas (Insulina, Transferrina y Albúmina rica en lípidos). (Vassiliev *et al.*, 2010).

Tabla 2. Composición del producto sintético KnockOut™ Serum Replacement (las concentraciones no fueron especificadas).

Componentes	Ingredientes
Amino Ácidos	Glicina, L-Histidina, L-Isoleucina, L-Metionina, L-Fenilalanina, L-Prolina, L-Hidroxiprolina, L-Serina, L-Treonina, L-Triptófano, L-Tirosina, L-Valina
Vitaminas y antioxidantes	Tiamina, Glutati6n reducido, 1cido asc6rbico
Elementos traza	Ag ⁺ , Al ³⁺ , Ba ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cr ³⁺ , Ge ⁴⁺ , Se ⁴⁺ , Br ⁻ , I ⁻ , F ⁻ , Mn ²⁺ , Si ⁴⁺ , V ⁵⁺ , Mo ⁶⁺ , Ni ²⁺ , Rb ⁺ , Sn ²⁺ , Zr ⁴⁺
Proteínas	transferrina, insulina, albúmina

Fuente: Price *et al.* (1998)

Garcia-Gonzalo & Izpisúa-Belmonte (2008), demostraron que la inclusi6n de KSR en los medios de cultivo favorecería la expansi6n y auto renovaci6n de las células madre embrionarias humanas, también ha demostrado que la Albúmina rica en lípidos es el componente responsable del efecto positivo de KSR en las células madre embrionarias humanas. Además, reveló que los lípidos son determinantes en el efecto

simulador de auto renovación, no así la albúmina ya que este efecto era resistente a la Tripsina.

Youssefi et al. (2016), en el año 2016 demostraron que la introducción de KSR en el medio de cultivo aumentaría notablemente la proliferación y auto renovación de las células madre espermatogoniales durante el cultivo *in vitro* y además que podría ayudar a enriquecer la suspensión celular antes del trasplante, aumentando así su eficiencia. La adición de fuentes de proteínas químicamente definidas, como el KSR, fue validado en sistemas de producción de embriones porcinos (Sakurai *et al.*, 2015).

La adición de KSR en el medio de calentamiento luego de la vitrificación fue similar a SFB, mostraron que aumentó la supervivencia, la capacidad de eclosión, hubo menor porcentaje de especies reactivas de oxígeno y menos daño de la membrana plasmática; así como también mayor actividad mitocondrial que los no suplementados (Xiang *et al.*, 2019).

El KSR al 5 % se probó en embriones y fue capaz de sustituir el SFB y la albúmina cuando se cultivó con 20 % de O₂, en la tasa de producción y eclosión de blastocistos dando como resultado tasas de desarrollo similares (Mingoti *et al.*, 2011)

Criopreservación de embriones

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas (Ávila *et al.*, 2006). Es decir, lograr el almacenamiento de embriones para mantener su integridad con la menor cantidad de agua y temperatura para su congelación, evitando la formación de cristales (Seidel, 2006a).

La congelación lenta hace posible obtener un equilibrio indispensable que evita factores que afectan a los embriones como la formación de cristales de hielo, fractura del embrión, alteraciones de las organelas intracelulares y el citoesqueleto (Ajta & Nagy, 2006)

La criopreservación exitosa también ocurre en embriones producidos *in vivo* en etapas similares de otras especies de rumiantes. Sin embargo, los embriones de rumiantes producidos *in vitro* son mucho más difíciles de criopreservar con éxito y los

embriones producidos *in vivo* de algunas razas sobreviven a la criopreservación con menos éxito que los de otras razas (Acero & Hasler, 2004)

El aumento paralelo en la proporción de embriones PIV congelados también sugiere mejoras en los sistemas de cultivo *in vitro*, ya que el éxito de la crio preservación depende directamente de la calidad del embrión (Viana, 2020). La mejor forma de contrarrestar las bajas tasas de éxito de ciertos tipos de células es modificar los procedimientos de crioconservación, por ejemplo, variando la concentración y los tipos de crioprotectores, probando diferentes tiempos y temperaturas en los procedimientos, aunque las mejoras pueden ser bastante limitadas (Leibo, 1981)

Supervivencia embrionaria *post*-congelación

Los ovocitos bovinos son particularmente difíciles de criopreservar con éxito y dan como resultado bajas tasas de producción de blastocistos después de la descongelación. Esto puede deberse en parte al gran tamaño de los ovocitos, con la consiguiente baja relación superficie-volumen, lo que dificulta que el agua y los crioprotectores se muevan a través de las membranas plasmáticas celulares (Seidel, 2006).

Los embriones criopreservados producidos *in vitro* suelen ser menos viables después de la congelación/descongelación en comparación con los embriones derivados *in vivo*, la escasa viabilidad de los embriones producido *in vitro* está asociada a factores intrínsecos de los sistemas de cultivo utilizados, que interfieren en el metabolismo embrionario (Abe et al., 2001).

Una forma posible de aumentar la viabilidad del embrión es mediante el uso de métodos de criopreservación alternativos, eficientes y prácticos. Los dos métodos utilizados para la criopreservación de embriones producidos *in vitro* bovinos son la vitrificación y congelación lenta programables (Ferre et al., 2020).

Camargo et al. (2022) en un estudio validó la efectividad del medio MB (líquido oviductal sintético alterado sin suero) en la producción *in vitro* de embriones bovinos con mayor criosupervivencia. El medio diseñado para mejorar la criosupervivencia de los

embriones puede aumentar el uso de embriones producidos *in vitro* para el manejo reproductivo del ganado en programas comerciales a gran escala.

Entre los antioxidantes más destacables están: el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX), el glutatión (GSH), la cisteína (CYS) y la cisteamina (CSH); los cuales previenen el estrés oxidativo eliminando radicales libres como $\cdot\text{OH}$ y H_2O_2 o indirectamente a través de moléculas secundarias (Ofosu et al., 2023)

Aislamiento de ARN

Para la homogenización o lisis de muestras de tejido se utiliza generalmente una mezcla de solventes orgánicos como tiocianato de guanidina y Fenol en una solución monofásica, lo que permite disolver eficazmente el ADN, el ARN y las proteínas. Posteriormente se añade cloroformo y se procede a centrifugar la muestra, obteniendo un espécimen dividido en 3 fases: una acuosa que es el ARN total, la interfase con el ADN y una orgánica con proteínas

Entre los desnaturalizantes proteicos más efectivos encontramos el Cloruro y Tiocianato de guanidinio estos actúan como inhibidor de las ribonucleasas, ciclooxigenasas, siendo un agente de desproteinización para el aislamiento de ARN. La extracción de Guanidinio se ha convertido en el método de elección para la purificación de ARN, reemplazando la extracción con Fenol-Guanidinio, estos métodos han sido utilizados con éxito por Chirgwin et al. (1979) para aislar sin degradar ARN de tejidos ricos en ribonucleasas como el páncreas.

Chomczynski & Sacchi, (1987), describieron un método que convierte el Fenol caliente con Guanidinio en una extracción de un solo paso que permite el aislamiento del ARN en 4 h y proporciona un alto rendimiento y pureza de las preparaciones de ARN no degradado. Además, permite la recuperación de ARN total a partir de pequeñas cantidades de tejido o células, lo que lo hace adecuado para estudios de expresión génica para los que solo se dispone de una cantidad limitada de material biológico.

Expresión de genes relacionados con el desarrollo del embrión

Alrededor de 10.000 genes deben expresarse en armonía para garantizar una preimplantación y un desarrollo fetal óptimo, pero en la actualidad son pocos los genes conocidos (Niemann & Wrenzycki, 2000). El mapa de genes bovinos comprende aproximadamente 1.500 marcadores y la base genómica real muestra alrededor de 5.800 genes (Kappes, 2000)

Se estima que en la actualidad hay más de 15 funciones fisiológicas que involucran la expresión de entre 60-70 genes diferentes. La gran mayoría de los genes se expresan de una forma específica en determinada etapa mostrando dos patrones principales de expresión el primero después del inicio de la actividad genómica (actividad embrionaria), y el segundo se da a lo largo del período anterior y posterior al comienzo de la transcripción embrionaria que indica actividades maternas y embrionarias (Niemann & Wrenzycki, 2000).

En un estudio realizado se demostró que los embriones murinos cultivados *in vitro* producen 7 veces menos Factor activador de plaquetas (PAF) que sus contrapartes *in vivo* (O' Neill, 1999)

Según Stojanov & O' Neill, (2000) se piensa que PAF y su receptor están involucrados en la elevación transitoria del calcio intracelular y, por lo tanto, son cruciales para el desarrollo previo a la implantación. La expresión del receptor de PAF se retrasó significativamente en cigotos cultivados *in vitro* y se demostró que los Factores de crecimiento I y II, los ligandos y los receptores, se ven afectados por el medio de cultivo. Por otro lado, el patrón de expresión cuantitativa de genes importantes para el desarrollo en embriones bovinos previos a la implantación se ve alterado por utilizar suero en el medio de cultivo básico de tejidos (Wrenzycki et al., 1999)

Según la literatura revisada, hay numerosos genes que codifican proteínas importantes para el desarrollo embrionario adecuado (Lonergan *et al.*, 2006). De ellos, los siguientes genes juegan un rol importante en el desarrollo embrionario temprano, y su expresión es indicativa de viabilidad de los embriones.

Aquaporina (AQP)

Las AQP son proteínas de membrana encargadas de transportar el agua a través de los compartimientos de las células, están formadas por un haz de seis hélices, dejando una estrecha abertura en su interior por la que pueden atravesar moléculas de agua que forman tetrámeros, una línea de 10 moléculas de agua en fila india que cruza en su interior (Correal, 2019).

Se cree que la AQP3 está involucrada en la formación del blastocelo en la embriogénesis de mamíferos y que la expresión de isoformas particulares de AQP3 son necesarias para la formación de blastocistos (Prieto *et al.*, 2016). También están implicadas en el flujo del agua dentro del útero, en la dilatación cervical durante la gestación, en el transporte de oocito en el oviducto, desarrollo folicular, formación del blastocito, implantación del embrión en el útero y la reabsorción del líquido amniótico (Correal, 2019)

La AQP7 es mucho más abundante en los eyaculados del bovino y la AQP11 está asociada con la resistencia de los espermatozoides a la congelación (Prieto *et al.*, 2016). Se cree que la AQP3 participa durante el desarrollo del embrión en el proceso de cavitación y formación del blastocelo, pero probablemente también esté involucrada de manera crucial en el proceso de rehidratación después de la vitrificación de embriones de FIV (Camargo *et al.*, 2011)

Transportador de Glucosa 3 (GLUT3)

La Glucosa es un regulador conocido de la expresión de GLUT tanto *in vivo* como *in vitro*. Se demostró que la privación de glucosa provoca una regulación positiva de GLUT 1 y 3 en células cromafines bovinas cultivadas (Nishimoto *et al.*, 2006). Hasta la actualidad se ha informado que GLUT1, 3 y 4 se expresan en el ovario de la oveja y también se demostró que la expresión de estos GLUT es regulada por factores intraováricos involucrados en el desarrollo folicular, maduración y ovulación (Zhou & Bievre, 2000).

Según Nishimoto *et al.* (2006) GLUT1, 3 y 4, se expresa en el ovario bovino, lo cual indica que juegan un papel fundamental en esta especie. No obstante, los resultados de su investigación indican que estas variedades de GLUT se expresan por

igual en los folículos en diversas condiciones fisiológicas. También se descubrió que el ARNm codifica GLUT1, 3 y 4; y se detectó que el transportador de alta afinidad GLUT3 se expresa en varios tejidos, con mayor predominancia en las células de la granulosa (GC). Se detectó al ARNm que codifica GLUT1, 3 y 4 en los folículos bovinos, aunque también se detectaron los mismos niveles de expresión de GLUT3 en tejidos del cerebro, corazón, en las células de la granulosa y de la teca interna (Nishimoto *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha reportado que el cuerpo lúteo expresa ARNm para GLUT1, 3 y 4. La expresión de GLUT3, aumenta en la etapa luteal IV, los niveles de ARNm de GLUT3 y 4 en el cuerpo lúteo eran comparables a los de los folículos, lo cual significa que existe un mecanismo regulador local de la captación de Glucosa, que compensa la privación de la misma y, por lo tanto, mantiene el suministro de energía vital para las células foliculares. Durante la fase lútea, los folículos dominantes pierden su dominio funcional aproximadamente 3 días después del inicio de esta fase y experimentan atresia. Uno de los primeros signos de atresia es la pérdida progresiva de la vascularización de la teca, por lo cual se reduce el suministro de Glucosa, nutrientes y Oxígeno a los folículos (Ali *et al.*, 2001).

Conexina 43 (Cx43)

La Cx43 es el miembro de la familia de las conexinas que se expresa mayoritariamente en el folículo ovárico y cuyo papel en la foliculogénesis es más relevante (Juneja *et al.*, 1999).

Estudios llevados a cabo con ratones *knock-out* para Cx43, exponen el papel esencial de esta molécula para mantener la comunicación entre las células de la granulosa. Los resultados obtenidos demuestran que se requiere la presencia de Cx43 para sostener la proliferación de estas células y la posterior maduración folicular. La Cx43 se detecta ya en los folículos primordiales y su presencia se hace más evidente con el crecimiento folicular (Gittes, 2005).

La hormona FSH estimula la síntesis de Cx43 e incrementa simultáneamente el número de canales intercelulares funcionales. Por el contrario, la hormona LH, en una respuesta inmediata, interrumpe la comunicación célula-célula, aparentemente por

fosforilación y modificación conformacional de la molécula de Cx43, lo que conduce al cierre de los canales (Lampe & Lau, 2004)

Interferón tau (IFN-t)

Los embriones producidos *in vitro*, cuando son sometidos al proceso de criopreservación, secretan menos IFN-t que los embriones frescos. Stojkovic *et al.* (1995), consideraron que el trauma de la criopreservación de embriones compromete la viabilidad de las células trofoblásticas y su capacidad para secretar IFN-t debido a lesiones causadas por los cambios bioquímicos en el embrión.

Las lesiones se producen en el trofoectodermo y en la masa celular interna, y son responsables de la disminución del número de células trofoblásticas en el blastocisto congelado (Kaidi *et al.*, 1999). Comprometen la integridad de las membranas de los orgánulos, el núcleo y la membrana celular, hecho que perjudica la calidad de los embriones y se refleja en su capacidad para secretar IFN-t (Demmers *et al.*, 2001).

El aumento de la secreción de IFN-t ocurre cuando el blastocisto comienza a elongarse y está directamente relacionado con el desarrollo del embrión. Godkin *et al.* (1997) afirmaron que en esta etapa del desarrollo embrionario se produce un aumento en el número y tamaño de las células trofoblásticas que serían las responsables de la mayor secreción de IFN-t (Kubisch *et al.*, 1998)

El proceso de congelación lenta compromete la secreción de IFN-t por los embriones bovinos producidos *in vitro*, y que la secreción de IFN-t a los siete días de cultivo, luego del inicio del cultivo de blastocistos es menor en los embriones descongelados. (Araújo *et al.*, 2005).

Esfingosina-1-fosfato fosfatasa 1 (SGPP1).

El gen SGPP1 codifica una proteína que actúa como una enzima importante en el metabolismo de diferentes mediadores intracelulares, la regulación del crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación, la migración, la supervivencia, la angiogénesis e incluido el reciclaje de la esfingosina (Singh *et al.*, 2019). Debido a que SGPP1 está involucrado en el control de los niveles celulares de diferentes mediadores, incluido S1P (Fosfato de esfingosina 1), que regula diversos procesos biológicos, se cree que SGPP1

podría tener un papel en el desarrollo embrionario temprano. Ghanem *et al.* (2014), descubrieron que los embriones bovinos producidos *in vitro* que mostraban una mayor criotolerancia embrionaria tenían una mayor abundancia de transcritos de SGPP1 y esto se asoció con lípidos citoplasmáticos más bajos.

Bcl-2 Associated X-protein (BAX)

El gen BAX es un miembro de la familia de genes Bcl-2 que codifica una proteína de 21 kDa cuya asociación con Bcl-2—desempeñan un papel fundamental en la regulación de la apoptosis (Apte et al., 1995)

Recientemente se ha demostrado que los embriones bovinos fragmentados exhiben cambios morfológicos típicos que se ajustan a los criterios de muerte celular apoptótica. Cuando Bax se sobre-expresa en las células, se acelera la muerte apoptótica por lo cual es determinante de la supervivencia o muerte celular (Oltvai et al., 1993)

En el estudio de Yang & Rajamahendran. (2002) se encontró que la expresión de Bax en ovocitos y embriones bovinos al parecer está asociada con las diferentes etapas de desarrollo, ya que la muerte apoptótica es responsable de la degeneración de los ovocitos y la fragmentación del embrión, por lo que la proporción de Bcl-2 y Bax determina si una célula vive o muere.

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

La GAPDH es una enzima que cataliza el sexto paso de la glucólisis, donde la Glucosa se convierte en 2 moléculas de Piruvato, también se ha demostrado que la GAPDH participa en varios procesos celulares no glicolíticos, como la reparación del ADN, la fusión y el transporte de membranas, la dinámica del citoesqueleto y la muerte celular. (Yogalingam et al., 2013)

GAPDH, que cataliza la conversión de Gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato, es una enzima típica de pluriempleo. La expresión superficial y la función adhesiva se han confirmado para un número cada vez mayor de bacterias, incluidas las especies *de* Estreptococos, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Lactobacillus reuteri*, *Mycoplasma pneumoniae* (Wang et al., 2021)

Materiales y Métodos

Materiales

En este estudio se utilizaron materiales químicos, biológicos, equipos, instrumentos del laboratorio, equipo de oficina y material desechable.

Tabla 3. Materiales que se utilizaron en el estudio.

Materiales		
Desechables: Tubos Falcon, 15 ml Microtubos, 1.5 y 2 ml Cajas Petri de 100 mm Cajas Petri de 35 mm Cajas de cultivo/pocillos Papel absorbente Pipetas Pasteur Puntas de micropipetas Oficina: Cuaderno Esferos Marcadores Calculadora	Biológicos: Ovarios de camal Semen congelado Químicos: Jabón Alcohol 70% Solución fisiológica Aceite mineral Medios de maduración, fecundación y cultivo <i>in vitro</i> Medio de congelación Nitrógeno líquido Plantilla: ARN	Laboratorio: Equipos: Estereoscopio Microscopio Baño María Platinas térmicas Microcentrífuga Cámara de flujo laminar Refrigeradora/congelador Congelador de embriones Instrumentos de medición: Balanza analítica Potenciómetro o pHmetro Osmómetro Micropipetas
Reactivos		
L-Glutamina FSHp (Folltropin, Vetoquiol) Estradiol Cisteamina Lactato sódico Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) BSA sin ácidos grasos Piruvato de sodio	Cloruro de Magnesio 6 H ₂ O (MgCl ₂ 6H ₂ O) Citrato trisódico Mioinositol BSA-FAF MEM aminoácidos BME aminoácidos BSA-F Aceite Mineral	

Solución PHE (2 mM)	KnockOut serum replacement (Gibco™)
penicilamina, 1 mM	Fetal calf serum
hipotaurina, y 250 µM epinefrina)	Cebador:
Heparina	Oligo (dT)18 Primer
Gentamicina	Random Primers
Agua probada para embriones, csp	Mezcla de dNTP
Glutamina	Inhibidor de la ribonuclease:
Cloruro de sodio	RNaseOUT
Fosfato ácido de potasio (KH ₂ PO ₄)	Ribonucleasa H (RNasa H) de E. coli
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	Agua DEPC
Cloruro de calcio 2 H ₂ O (CaCl ₂ H ₂ O)	

Procedimiento:

Localización de la investigación

Los ovarios bovinos fueron recolectados en el Camal Municipal "EMULPLAG" de la ciudad de Cuenca y luego transportados al laboratorio Singamia, ubicado en la misma ciudad de Cuenca, provincia del Azuay. En este laboratorio se llevó a cabo la producción de embriones bovinos *in vitro*. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, donde se realizó la extracción de ARN. Por último, la determinación de la expresión de genes se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de San George, ubicado en la Isla Caribeña de Granada.



Figura 1. Localización del laboratorio Singamia en la ciudad de Cuenca

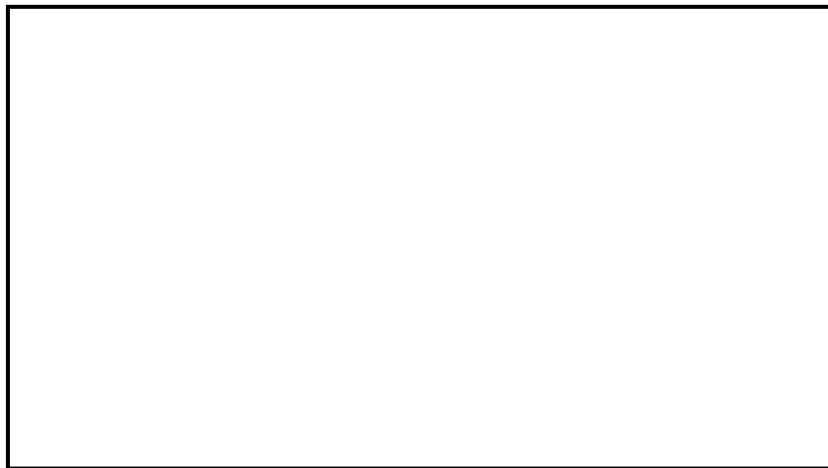


Figura 2. Localización del laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca



Figura 3. Localización del laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Medios utilizados

Los medios que se usaron en esta investigación fueron elaborados en el laboratorio Singamia. Los reactivos para preparar los medios fueron de Sigma-Aldrich y Merk. En las Tablas 4, 5, 6 y 7 se describen la composición de los medios.

Tabla 4. Composición del medio de maduración *in vitro*

Reactivo	Cantidad
TCM-199 + 10 ng /mL EGF + 10% (v/v) SFB, csp	Cantidad a requerir
FSHp	25 UI/mL
Estradiol	1 μ g/mL
Cisteamina	100 μ M
Gentamicina	50 μ g/mL

Csp: cantidad suficiente para

Tabla 5. Composición del medio de fecundación *in vitro* (FERT-TALP)

Reactivo	Cantidad
Medio FERT-TALP	
Lactato sódico	13 mM
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	25 mM
BSA sin ácidos grasos	6 mg/mL ⁻¹
Piruvato de sodio	0,2 mM
Solución PHE (2 mM Penicilamina, 1 mM Hipotaurina, y 250 μ M Epinefrina)	4 μ L/mL
Heparina	10 μ g mL ⁻¹
Gentamicina	50 μ g mL ⁻¹
Agua probada para embriones, csp	Cantidad a requerir

Tabla 6. Composición del medio de cultivo *in vitro* (SOF-CIT)

Reactivo	Cantidad
Medio SOF-CIT	
Glutamina	0,20 mM
Cloruro de sodio	107,63 mM
Cloruro de potasio	7,16 mM
Fosfato ácido de potasio (KH ₂ PO ₄)	01,19 mM
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	1,51 mM
Cloruro de calcio 2H ₂ O (CaCl ₂ H ₂ O)	1,78 mM
Bicarbonato de potasio (NaHCO ₃)	25 mM
Lactato de sodio	5,3 mM
Gentamicina	50 µg/mL
Piruvato de sodio	7,27 mM
Citrato trisódico	0,34 mM
Mioinositol	2,77 mM
BSA-FAF	4 mg/mL
MEM aminoácidos	10 µL/mL
BME aminoácidos	30 µL/mL
BSA-FAF	3 mg/mL
Gentamicina	50 µg mL ⁻¹
Mioinositol	2,77 mM
Agua probada para embriones, csp	Cantidad a requerir

Tabla 7. Composición del medio HEPES-fluido oviductal sintético (hSOF)

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio	107,63mM
Cloruro de potasio	7,16mM
KH ₂ PO ₄	0,29mM
Bicarbonato de sodio	5mM
Hepes AF	10mM
Hepes SS	10Mm
Piruvato de sodio	4,99
BSA FAF	3 mg/ mL
Cloruro de calcio 2H ₂ O	1,71

Lactato de sodio 60 %	5,35 mM
Gentamicina	50 µg/mL
Agua Ultra pura	Cantidad suficiente

Recolección de ovarios

Los ovarios fueron obtenidos dos veces a la semana del Camal Municipal de Cuenca “EMURPLAG EP” hasta completar 600 complejos ovocito-células del cúmulo (COCs). Inmediatamente después del sacrificio, los ovarios fueron removidos y almacenados en un termo con solución salina fisiológica atemperada a 25-30b°C con Gentamicina, y transportados en un tiempo no mayor a 3 horas. En el laboratorio Singamia los tejidos adyacentes fueron removidos y los ovarios lavados repetidamente en solución salina fisiológica a 37,5 °C hasta quedar libre de sangre y detritos.

Obtención de ovocitos

Los COCs de cada ovario fueron obtenidos mediante punción folicular con una jeringa desechable acoplada a una aguja de 20 G. Se aspiraron todos los folículos con un diámetro entre 3 y 8 mm. El líquido folicular se depositó en tubos Falcon de 15 ml, mantenidos en una placa térmica a 37,5 °C.

Los ovocitos se acumularon por decantación en el fondo cónico del tubo y se eliminó el sobrenadante, conservándose la pastilla que luego se succionó con una pipeta Pasteur y se depositó en una placa Petri de 100 mm. Posterior se procedió a la búsqueda, identificación y selección de COCs bajo la luz de un microscopio estereoscopio (Olympus, SZ61, Japón).

Los COCs seleccionados fueron transferidos a gotas de 200 µL de medio hSOF (fluido oviductal sintético tamponado con HEPES) con el fin de lavarlos y librarlos de restos celulares.

Evaluación y clasificación de COC's

Los COCs seleccionados se clasificaron en tres categorías según el criterio indicado por Hawk y Wall (1994). Categoría 1: COCs con varias capas compactas de células cúmulo, zona pelúcida intacta, citoplasma homogéneo, denso y finamente

granulado; categoría 2: COCs con dos o más capas compactas de células del cúmulo cubriendo totalmente o al menos la mitad del ovocito, zona pelúcida intacta, con un citoplasma menos homogéneo, cuyos gránulos varían desde uniformes, densos y finamente granulados hasta gránulos de tamaño moderado; categoría 3: COCs con células del cúmulo parcial o totalmente expandidas, ovocitos excepcionalmente grandes o pequeños o con un cúmulo de color anormal (negro o marrón claro). En este estudio se usaron únicamente COCs de categoría 1 (buena calidad) y 2 (calidad intermedia).

Maduración de ovocitos

Los ovocitos fueron colocados en microgotas de 90 μL de medio de maduración, cubiertas con aceite mineral, 20-25 COCs por gota, e incubados durante 24 horas a 38,5 $^{\circ}\text{C}$, en un ambiente con 5 % de CO_2 y humedad de saturación máxima en la incubadora (Memmert, ICOMed, Alemania). En la Tabla 4 se detalla la composición del medio de maduración.

Fecundación in vitro

Una vez lavados en medio FIV, los COCs madurados *in vitro* fueron transferidos a gotas de 90 μL (20-25 COCs por gota) de medio de fecundación (cubiertas con aceite mineral) suplementado con Heparina, y coincubados con espermatozoides bovinos (1 X 10^6 espermatozoides/ml en cada microgota) en la incubadora de CO_2 durante 22-24 horas, en un ambiente a 38,5 $^{\circ}\text{C}$, al 5 % de CO_2 y humedad de saturación. En la Tabla 5 se encuentra la composición del medio de fecundación.

Cultivo in vitro y asignación de tratamientos

Luego de finalizada la FIV, las células del cúmulo de los presuntos cigotos fueron removidas mecánicamente. Las estructuras se distribuyeron aleatoriamente en microgotas de 50 μL (20-25 estructuras por gota) de medio de cultivo (Tabla 6) suplementado con: 1) 5 % de Knockout Serum Replacement (**KSR**; n = 100; 2) 5 % de Suero Fetal Bovino (**SFB**; n = 100); 3) 0,6 % de Albúmina Sérica Bovina (**CON**; n = 100). Inmediatamente las placas de cultivo fueron colocadas en una incubadora Trigas (Memmert, ICO50med, Alemania) durante un periodo de 6 días, a una temperatura de 38,5 $^{\circ}\text{C}$, 5 % de N_2 , 5 % de CO_2 y humedad de saturación. A las 48 horas después de

la FIV se hizo una evaluación para cuantificar los embriones que avanzaron a estadios de dos o más células, y determinar las tasas de clivaje.

En el día 7 de iniciada la FIV, los embriones fueron nuevamente evaluados y de acuerdo con el estadio de desarrollo alcanzado, se les categorizó en mórulas (M), blastocistos tempranos (BT), blastocistos regulares (BR), blastocistos expandidos (BEx) y blastocistos eclosionados (BE).

Congelación de blastocistos

Luego de la evaluación y clasificación de embriones, los blastocistos de calidad 1 fueron sometidos a un protocolo de congelación lenta, que incluyó exposición de los embriones por 10 minutos a temperatura ambiente en una solución comercial de Etilenglicol (EG; Ethylene Glycol Freeze Plus, ViGRO™, Vetoquinol, Canadá), para congelación de embriones bovinos. Luego, cada embrión se cargó en una pajuela de 0,25 mL en una columna central de solución de EG, con otras dos columnas a cada extremo de la pajuela separadas por una de aire. Inmediatamente, cada pajuela fue sellada por calor.

Posteriormente, las pajuelas con los embriones se colocaron en una congeladora (Freeze Control, Modelo CL 5500; Cryologic, Australia) previamente estabilizada a -6 °C ((Masahiro et al., 2014)

Dos minutos después se realizó el *seeding* (cristalización) en la columna anterior a la que se encontraba el embrión. Las pajuelas permanecieron a una temperatura de -6 °C por 10 minutos, luego, según la curva programada, comenzó el descenso de temperatura a una tasa de 0,5 °C por minuto hasta llegar a -35 °C; temperatura en la que permanecieron durante 10 minutos. Al final, los embriones fueron sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados hasta su posterior evaluación.

Para la descongelación, los embriones fueron recuperados del termo de Nitrógeno líquido y se les expuso durante 10 segundos a temperatura ambiente (15 a 18 °C) y luego fueron sumergidos en agua a 30 °C por 20 segundos (Senna Netto, 2020)

Incubación de blastocistos luego la descongelación

Luego de descongelados, los blastocistos fueron cultivados por 24 horas para determinar la tasa de reexpansión. Culminado ese período, los blastocistos se evaluaron morfológicamente antes de ser seleccionados para la expresión génica, escogiéndose los que fueron capaces de re-expandir su blastocele durante las 24 horas de cultivo luego de la descongelación. Se completaron seis réplicas por grupo experimental y en cada réplica se incluyeron tres *pools* con 3-4 blastocistos por tratamiento. Cada pool de blastocistos se sometió individualmente a la extracción de ARN total.

Extracción de ARN

Para la homogenización o lisis de muestras de tejido se utilizó el reactivo TRI Reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) que es una mezcla de Tiocianato de guanidina y Fenol en una solución monofásica, lo que permitió disolver eficazmente el ADN, el ARN y las proteínas. Posteriormente se añadió cloroformo y se procedió a centrifugar por 10 minutos a 14.000 gravedades, obteniendo una muestra dividida en 3 fases: una acuosa que contenía el ARN total, la interfase con el ADN y una orgánica con proteínas, lo que permitió aislar a cada uno.

Síntesis de ADN complementario (cDNA)

Debido a que la determinación de la expresión génica se realizó en el laboratorio de biología molecular de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Saint George, en Granada, para enviar las muestras sin riesgo de deterioro del material genético, se sintetizó cDNA a partir del ARN total extraído de las muestras, ya que por ser una molécula estable puede ser transportado a temperatura ambiente. Para la síntesis de cDNA se usó el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript™ IV con la enzima ezDNase™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), con Hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molécula de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca.

Determinación génica

La determinación de la expresión génica se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de San George mediante el método de PCR dúplex en tiempo real (qRT-PCR) utilizando el reactivo TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Para garantizar una alta eficiencia de amplificación, las reacciones de RT-qPCR se realizaron por duplicado, utilizándose un valor *Cq* medio para determinar el nivel de expresión del gen. La cantidad relativa del gen de Aquaporina se normalizó con respecto al gen HMBS (Hydroxymethylbilane synthase) (Luchsinger et al., 2014) control endógeno y con respecto a un calibrador. En la Tabla 8 se describe el gen de interés y el de referencia (gen *housekeeping*).

La cuantificación relativa de la expresión del gen de Aquaporina se realizó con el método delta-delta Ct (CITA), Este método expresa la proporción entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del gen de referencia y se estima con la siguiente ecuación:

Tabla 8. Expresión génica TaqMan®

Target/endogenous genes	TaqMan gene expression assays ID	Amplicon size (bp)	Fluorescent dye
Aquaporin 3 (AQP3)	Bt03253663_m1 4448892	79	FAM-MGB
Hydroxymethylbilane synthase (HMBS)	Bt03234763_m1 4448489	63	VIC-MGB-PL

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente analizados estadísticamente con el programa SAS (SAS®; Version 9.3; SAS Institute,

Inc., Cary, NC, USA). Se aplicó un modelo lineal completamente aleatorizado. Se consideraron variables independientes a los 3 tratamientos: KSR, SFB, CON. Como variables dependientes del objetivo 1 se analizaron: 1) la tasa de clivaje (día 2 *post*-FIV; 2) la proporción de embriones en diferentes estadios de desarrollo (M, BT, BR, BE, BP); y 3) la proporción de embriones que alcanzaron el estadio de blastocistos (día 7 *post*-FIV). Como variables dependientes del objetivo 2 se analizaron: 1) la proporción de embriones que eclosionaron durante las 24 horas de cultivo luego de la descongelación; 2) la expresión relativa del gen de Aquaporina 3. Las variables numéricas fueron transformadas al logaritmo 10 y las porcentuales al arcoseno. Los datos se examinaron mediante el análisis de varianza utilizando el modelo lineal general (GLM). Las medias fueron comparadas con el método de los mínimos cuadrados (LSM). Se consideran significativos los valores de $p < 0,05$, y tendencia los comprendidos entre 0,05 y 0,10.

Resultados

En el estudio se utilizaron 1530 ovocitos de buena calidad para la MIV. La tasa de clivaje fue similar entre los diferentes tratamientos, variando entre el 68 y el 74% (Tabla 9). Las proporciones de embriones totales, blastocistos y embriones tempranos (mórulas y blastocistos tempranos) no presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Sin embargo, se observó que, en los grupos suplementados con SFB o KSR se obtuvo diferencia altamente significativa en la tasa de embriones regulares en comparación con el grupo control. Por otro lado, en estadios avanzados (blastocistos expandidos y eclosionados) se observó diferencia estadística del 10% entre el grupo control y los otros dos tratamientos.

Tabla 9. Efecto del Knockout Serum Replacement o del suero fetal bovino sobre el número promedio de cigotos clivados y en las diferentes categorías de embriones producidos

Estructuras (n)	Tratamientos (promedio ± error estándar)		
	KSR % (n)	SFB % (n)	CON % (n)
Nro. ovocitos	504	514	512
Clivaje	74,0 ± 2,3 (378)	68,0 ± 2,3 (346)	72,9 ± 2,3 (385)
Embriones totales	24,9 ± 1,9 (20)	26,0 ± 1,9 (24)	26,3 ± 1,9 (31)
Blastocistos	21,1 ± 1,9 (12)	21,3 ± 1,9 (19)	20,1 ± 1,9 (18)
Embriones			
<i>tempranos</i>	31,2 ± 5,2 (42)	31,1 ± 5,2 (45)	40,4 ± 5,2 (22)
<i>regulares</i>	31,5 ± 4,6 (34) ^a	35,8 ± 4,6 (39) ^a	13,6 ± 4,6 (41) ^b
<i>avanzados</i>	37,2 ± 4,9 (18) ^c	33,0 ± 4,9 (4) ^c	45,9 ± 4,9 (23) ^d

Valores con letra diferente en la misma línea difieren: ^{a-b} $p < 0,01$; ^{c-d} $p = 0,0722$. SFB: suero fetal bovino. KSR: Knockout Serum Replacement. CON: Control

Después de la descongelación y la incubación durante 24 horas, se observó que un mayor número de blastocistos del grupo control (CON) experimentaron re-expansión en comparación con los grupos suplementados con SFB y KSR. Además, se encontró que en los blastocistos no suplementados (CON), el porcentaje de re-expansión fue 1,58 y 1,75 veces mayor en comparación con los blastocistos suplementados con SFB y KSR respectivamente. Estas diferencias fueron altamente significativas ($p < 0,001$).

Tabla 10. Efecto del Knockout Serum Replacement o del Suero Fetal Bovino sobre la reexpansión de blastocistos a las 24 horas luego de la descongelación.

	Tratamientos (promedio \pm error estándar)		
	KSR	SFB	CON
Reexpansión			
Número	4,3 \pm 0,8 ^{a, b}	5,5 \pm 0,8 ^b	7.6 \pm 0,8 ^c
Porcentaje	42,3 \pm 5,0 ^d	47,4 \pm 5,0 ^d	75,0 \pm 5,0 ^e

Valores con letra diferente en la misma línea difieren: ^{a-c} $p = 0,0122$; ^{b-c} $p = 0,0931$; ^{d-e} $p < 0,001$, SFB: suero fetal bovino. KSR: Knockout Serum Replacement. CON: Control

En la Figura 4 se presenta la expresión relativa del gen Aquaporina 3 en blastocistos luego de la descongelación, lo que indica que no hubo diferencia estadística entre tratamientos, ($p > 0,05$).

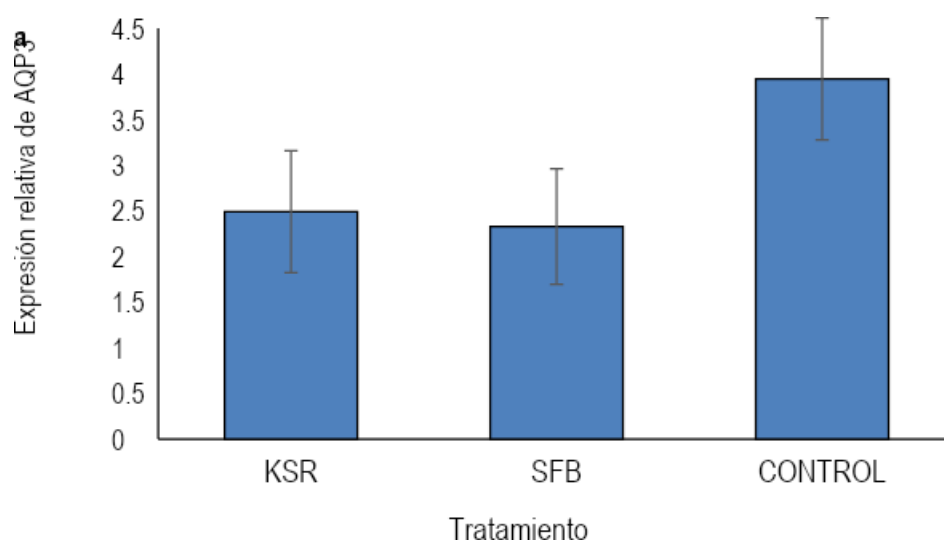


Figura 4. Expresión del gen de Aquaporina 3 en blastocistos descongelados.

^a $p = 0,0907$

Discusión

En este estudio se probó el uso de un sustituto de SFB disponible comercialmente (KSR), para la producción de ovocitos *in vitro* de embriones bovinos en un intento de establecer un sistema de cultivo más definido y eliminar la variabilidad y los atributos perjudiciales del suero.

Es así que se encontró que la tasa de clivaje fue similar entre tratamientos, con una variación de seis puntos porcentuales entre los grupos que tuvieron mayor y menor porcentaje de clivaje. Estos resultados concuerdan con Aguirre, (2022) quien comparo grupos de embriones cultivados con KSR, SFB y CON. Además, estudios realizados por (Amaral et al., 2022; Gomes et al., 2019; Rizos et al., 2002), quienes compararon grupos de embriones cultivados con y sin SFB, tuvieron resultados similares, aunque los porcentajes en algunos de esos estudios fueron mayores que los observados en esta investigación. Es evidente que la tasa de clivaje iba a ser similar entre los tratamientos debido a que el efecto de los suplementos usados comenzó una vez iniciado el cultivo, cuando el proceso de la fecundación de los ovocitos ya había ocurrido.

Con relación al porcentaje de blastocistos en el día 7 *post-FIV*, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, resultados que difieren con los obtenidos por Aguirre (2022) y Moore et al. (2007) quienes reportaron un mayor efecto con la suplementación de SFB o KSR en el medio de cultivo. Además, Amaral et al. (2022) observaron que ambos suplementos incrementaron la producción de blastocistos, con diferencia significativa con respecto al control (BSA) sólo en el día 6 *post-FIV*.

Entre los hallazgos de nuestro estudio encontramos que el grupo control obtuvo 1,4 - 1,2 veces más embriones avanzados (blastocistos expandidos y eclosionados) que el SFB y KSR respectivamente. Lo que difiere con el estudio realizado, por Amaral et al., (2022) quien obtuvo un mayor número de desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocisto tanto en SFB y KSR.

En esta investigación los medios utilizados en el cultivo embrionario contenían suero fetal bovino (SFB) o albúmina (CON) como fuente de proteína. Estudios previos han demostrado que estos productos tienen efectos beneficiosos sobre el desarrollo embrionario. Por ejemplo, Mucci *et al.* (2006) encontró que la presencia de suero aceleró

el desarrollo de mórulas y blastocistos en comparación con aquellos desarrollados en ausencia de suero.

Sin embargo, la adición de SFB en los medios de cultivo puede provocar diferencias morfológicas y fisiológicas en los embriones como un mayor número y tamaño de las gotitas de lípidos y cambios en la calidad del embrión. Aunque el SFB proporciona sustratos energéticos, aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y quelantes de metales pesados, aún se desconoce su papel exacto en el desarrollo embrionario *in vitro*. Además, se debe tener en cuenta que la presencia o concentraciones de estos componentes pueden variar entre lotes (Masahiro et al., 2014)

Por otro lado, el KSR fue desarrollado para el aislamiento y mantenimiento de células madre embrionarias, que se originan de la masa celular interna del embrión en etapa de blastocisto (Ward *et al.*, 2002), y también ha demostrado ser efectivo para aislar células germinales embrionarias de células germinales primordiales en ratones (Horii *et al.*, 2003).

Este suplemento sintético contiene aminoácidos, Glucosa, Insulina, Transferrina, antioxidantes, sales inorgánicas, oligoelementos y una mezcla patentada de proteínas y vitaminas (Price, 1988), aunque su composición química exacta se desconoce.

Bajo las condiciones en las que se llevó a cabo esta investigación, luego de la descongelación e incubación por 24 horas, se observó un número mayor de blastocitos expandidos en el grupo suplementado con albúmina sérica bovina (CON) que con KSR o SFB. Estos hallazgos son consistentes con los observados en un estudio previo en nuestro laboratorio (Aguirre, 2022), en los que la adición de KSR y SFB redujo 2,7 y 1,9 veces la tasa de eclosión de blastocistos a las 48 horas de incubación, luego que los embriones fueron descongelados. No obstante, difieren de los observados por Moore et al. (2007), quienes observaron una viabilidad significativamente mayor a las 48 y 72 horas de incubación, aunque ellos criopreservaron los embriones mediante vitrificación.

Para evaluar el efecto de la suplementación de KSR en el medio de CIV sobre la supervivencia de los blastocistos post descongelación, se utilizó la expresión del gen de Aquaporina 3 en los diferentes tratamientos. Como está documentado, estas proteínas están asociadas en el movimiento de fluidos a través del trofoectodermo durante la formación de blastocistos y modulan la capacidad del embrión para

rehidratarse. La importancia de estas proteínas de membrana es que funcionan como canales moleculares de agua que permiten que el agua fluya rápidamente a través de las membranas plasmáticas en la dirección de los gradientes osmóticos (Krusse & Uehlein, 2006). Estos resultados también son consistentes con los observados por Amaral *et al.* (2022), quienes encontraron que los embriones suplementados con 3 % de KSR tuvieron tasas menores de preñez, una vez que fueron transferidos en fresco.

Wohlres-Viana *et al.* (2011) considera que la composición del cultivo *in vitro* y la adición de suplementos al mismo, pueden causar alteraciones en la expresión génica de AQP3; lo cual coincide con los estudios de Camargo & Powell (2005), quienes observaron que estos transcritores se expresan diferencialmente en blastocistos bovinos producidos *in vivo*, en comparación con los producidos *in vitro*, esto puede deberse a las diferencias en el contenido de sustancias entre el medio de cultivo *in vitro* y el del fluido oviductal y uterino.

Rizos *et al.* (2003) encontraron que la presencia de SFB en el medio de cultivo tuvo un impacto en la velocidad del desarrollo embrionario y la calidad de los blastocistos resultantes. Además, observaron que los niveles de ARNm de los genes involucrados durante el desarrollo embrionario se vieron afectados por las condiciones de cultivo posteriores a la fertilización. Por lo tanto, la omisión del SFB del medio de cultivo puede tener un efecto significativo en la criotolerancia del blastocisto. Por otro lado, la adición de SFB al medio de cultivo resultó en un aumento significativo de los genes relacionados con la comunicación a través de uniones gap, apoptosis, estrés oxidativo, diferenciación celular e implantación. Sin embargo, los niveles de expresión del gen relacionado con el reconocimiento materno y el gen Cx43 asociado a la comunicación de uniones *gap* disminuyeron.

En nuestro estudio, sin embargo, la expresión del gen de Aquaporina 3 fue alrededor de 1,7 veces mayor en el grupo de embriones CON, suplementados con albúmina sérica bovina, que en los suplementados con KDR y SFB. Esto es consistente con los resultados de viabilidad post criopreservación, en los que se observó mayor crioresistencia en los embriones cultivados con albúmina. Previamente, se demostró que el SFB afectó la sobrevivencia embrionaria post-criopreservación, debido a que durante el cultivo los embriones acumularon cantidades importantes de lípidos intracitoplasmáticos (Sudano *et al.*, 2012) que disminuyó su criotolerancia (Mucci *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2003; Sudano *et al.*, 2012)

Se ha reportado que el KSR contiene albumina rica en lípidos, lo que produce acumulación excesiva de gotitas de lípidos intracelulares durante el desarrollo embrionario *in vitro*, provocando daño en la calidad de los embriones, aumentando su sensibilidad al estrés oxidativo y disminuyendo la capacidad de criopreservación (Botigelli et al., 2018). Esto podrá explicar por qué los embriones que se desarrollaron en un medio cultivo suplementado con KSR alcanzaron una tasa de sobrevivencia comparable a los que se le adicionó al medio SFB, y bastante menor a los que se desarrollaron en presencia de albúmina sérica bovina. Dados estos resultados, es evidente que la albúmina sérica bovina usada en este estudio en el grupo CON estaba ligada a mucho menos lípidos.

Por lo tanto, la hipótesis planteada en esta investigación no se cumplió, por lo que es necesario buscar otras fuentes de proteínas químicamente definidas que, además de estimular el desarrollo embrionario y mejorar la tasa de blastocistos de excelente calidad, no desmejoren la criotolerancia de los embriones, cuando sea necesario conservarlos para uso posterior.

Conclusiones

Como resultado de esta investigación se concluye que:

1. Los embriones suplementados con SFB y CON produjeron un mayor porcentaje de blastocistos totales y menor porcentaje de mórulas y blastocistos tempranos que los cultivados con KSR.
2. Luego de la *post*-congelación se encontró que en los blastocistos suplementados (CON), el porcentaje de re-expansión fue mayor en comparación con los blastocistos suplementados con SFB y KSR.
3. En la expresión de Aquaporina 3 no hubo diferencia significativa entre los tratamientos.

Referencias

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., & Hoshi, H. (2001). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, 61(1), 57–66. <https://doi.org/10.1002/mrd.1131>
- Aguirre Durán, H. E. (2022-10-06). *Efecto del KnockOut™ Serum Replacement y del suero fetal bovino en el cultivo y criotolerancia de embriones bovinos producidos in vitro* (Bachelor's thesis). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/40073>
- Ali, A., Lange, A., Gilles, M., & Glatzel, P. S. (2001). Morphological and functional characteristics of the dominant follicle and corpus luteum in cattle and their influence on ovarian function. *Theriogenology*, 56(4), 569–576. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00589-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00589-1)
- Amaral, T. F., de Grazia, J. G. V., Martinhao, L. A. G., De Col, F., Siqueira, L. G. B., Viana, J. H. M., & Hansen, P. J. (2022). Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11447-7>
- Apte, S. S., Mattei, M.-G., & Olsen, B. R. (1995). Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3–q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX δ . *Genomics*, 26(3), 592–594. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80180-t](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80180-t)
- Araújo, M. C. C., Vale Filho, V. R., Ferreira, A. M., Sá, W. F., Barreto Filho, J. B., Camargo, L. S. A., Serapião, R. V., & Silva, M. V. G. B. (2005). Interferon tau secretion in cattle embryos in vitro fertilized before and after cryopreservation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(6), 752–756. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352005000600008>
- Bavister. (1995). *Cultivo de embriones preimplantacionales: Hechos y artefactos*.
- Botigelli, R. C., Razza, E. M., Pioltine, E. M., Fontes, P. K., Schwarz, K. R. L., Leal, C. L. V., & Nogueira, M. F. G. (2018). Supplementing in vitro embryo production media by NPPC and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene

- expression of bovine cumulus-oocyte complexes and embryos. *Reproductive biology*, 18(1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.01.004>
- Camargo, J., Rodrigues, R., Valente, R. S., Müller, D. B., Vireque, A., Belaz, K. R. A., Bohrer, R. C., Basso, A., Eberlin, M. N., Fontes, P. K., Nogueira, M. F. G., & Sudano, M. J. (2022). Evaluation of a serum-free culture medium for the enhanced vitrification cryosurvival of bovine in vitro-derived embryos. *Livestock Science*, 260, 104922. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.104922>
- Camargo, L. S., Powell, A. M., do Vale Filho, V. R., & Wall, R. J. (2005). Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by in vitro fertilisation or somatic cell nuclear transfer. *Reproduction, fertility, and development*, 17(5), 487–496. <https://doi.org/10.1071/rd04128>
- Cao, B., Qin, J., Pan, B., Qazi, I. H., Ye, J., Fang, Y., & Zhou, G. (2022). Oxidative Stress and Oocyte Cryopreservation: Recent Advances in Mitigation Strategies Involving Antioxidants. *Cells*, 11(22), 3573. <https://doi.org/10.3390/cells11223573>
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., & Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18(24), 5294–5299. <https://doi.org/10.1021/bi00591a005>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Correal, S. B. (2019, October 4). *Identificación, localización y función de las acuaporinas en el espermatozoide equino y su relación con la criopreservación*. <http://hdl.handle.net/10803/669410>
- Demmers, K. J., Derecka, K., & Flint, A. (2001). Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(1), 41–49. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210041>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Taiyeb, A. M., Campos-Chillon, F., & Ross, P. J. (2020). Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 55(6), 659–676. <https://doi.org/10.1111/rda.13667>
- Gittens, J. E., Barr, K. J., Vanderhyden, B. C., & Kidder, G. M. (2005). Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *Journal of cell science*, 118(Pt 1), 113–122. <https://doi.org/10.1242/jcs.01587>

- Gomes, D. S., Aragão, L. B., Lima Neto, M. F., Barroso, P. A. A., Paulino, L. R. F. M., Silva, B. R., Souza, A. L. P., Vasconcelos, G. L., Silva, A. W. B., & Silva, J. R. V. (2020). Supplementation of culture medium with knockout serum replacement improves the survival of bovine secondary follicles when compared with other protein sources during *in vitro* culture. *Zygote (Cambridge, England)*, *28*(1), 32–36. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000583>
- Guevara, O. E. Z. (2006, January 1). *Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos*. Repositorio Institucional Universidad Veracruzana. <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/9755>
- Izquierdo, D., Palomo, M.J., Mogas, T., & Paramio, M.T. (1995). Efecto de los ácidos grasos unidos a la albúmina sérica bovina (BSA) sobre la fecundación "in vitro" (FIV) y posterior desarrollo embrionario de ovocitos de cabras prepúberes. *ITEA, Inf. Téc. Econ. Agrar.*, *0*(16), 446-448.
- Juneja, S. C., Barr, K. J., Enders, G. C., & Kidder, G. M. (1999). Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biology of reproduction*, *60*(5), 1263–1270. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.5.1263>
- Kaidi, S., Van Langendonck, A., Massip, A., Dessy, F., & Donnay, I. (1999). Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, *52*(3), 515–525. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00148-X)
- Kappes S. M. (1999). Utilization of gene mapping information in livestock animals. *Theriogenology*, *51*(1), 135–147. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00237-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00237-4)
- Katska, L., Kauffold, P., Smorag, Z., Duschinski, U., Torner, H., & Kanitz, W. (1989). Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, *32*(5), 767–777. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(89\)90465-2](https://doi.org/10.1016/0093-691x(89)90465-2)
- Kruse, E., Uehlein, N., & Kaldenhoff, R. (2006). The aquaporins. *Genome biology*, *7*(2), 206. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-2-206>
- Kubisch, H. M., Larson, M. A., & Roberts, R. M. (1998). Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. *Molecular reproduction and development*, *49*(3), 254–260. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199803\)49:3<254::AID-MRD5>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199803)49:3<254::AID-MRD5>3.0.CO;2-N)

- Lampe, P. D., & Lau, A. F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(7), 1171–1186. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00264-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00264-4)
- Leibo, S. (1981). Preservation of ova and embryos by freezing. 1981.
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., & Evans, A. C. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65(1), 137–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.028>
- Luchsinger, C., Arias, M. E., Vargas, T., Paredes, M., Sánchez, R., & Felmer, R. (2014). Stability of reference genes for normalization of reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) data in bovine blastocysts produced by IVF, ICSI and SCNT. *Zygote (Cambridge, England)*, 22(4), 505–512. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000099>
- Marquant-Leguienne, B., & Humblot, P. (1998). Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*, 49(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00397-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00397-x)
- Marston, J. H., & Chang, M. C. (1964). The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *The journal of experimental zoology*, 155, 237–251. <https://doi.org/10.1002/jez.1401550211>
- Menezo, Y., & Khatchadourian, C. (1991). *The laboratory culture media*. 136-143.
- Menezo, Y., Veiga, A., & Pouly. (2000). *Tecnología de reproducción asistida (ART) en humanos: Hechos e incertidumbres*.
- Mermillod, P. (2011). Gamete and Embryo Technology | In Vitro Fertilization. En *Elsevier eBooks* (pp. 616-622). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00200-4>
- Mingoti, G. Z., Castro, V. S. D. C., Méo, S. C., Sá Barretto, L. S., & Garcia, J. M. (2011). The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 47(5–6), 361–367. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9400-0>
- Moore, K., Rodríguez-Sallaberry, C. J., Kramer, J. M., Johnson, S., Wroclawska, E., Goicoa, S., & Niasari-Naslaji, A. (2007). In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*, 68(9), 1316–1325. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.034>
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G. G., Hozbor, F., Cabodevila, J., & Alberio, R. H. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst

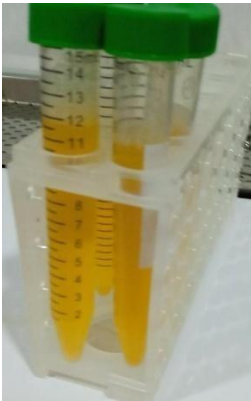
- development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65(8), 1551–1562. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.020>
- Niemann, H., & Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53(1), 21–34. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00237-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00237-x)
- Nishimoto, H., Matsutani, R., Yamamoto, S., Takahashi, T., Hayashi, K.-G., Miyamoto, A., Hamano, S., & Tetsuka, M. (2006). Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *Journal of Endocrinology*, 188(1), 111–119. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06210>
- O'Neill, C. (1997). Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro1. *Biology of Reproduction*, 56(1), 229–237. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.1.229>
- Oltval, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609–619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-o](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-o)
- Orsi, N. M., & Leese, H. J. (2004). Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology*, 61(2–3), 561–572. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00206-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00206-1)
- Palasz AT. 1996. Cultivo de embriones bovinos: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos. En: *IIº Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal Córdoba*. Argentina. Pp 185-94.
- Palma, G. A. (2008). *Biotechnología de la reproducción*. Producción in vitro de embriones. Ediciones INIA
- Park, Y.-S., Kim, S.-S., Kim, J.-M., Park, H.-D., & Byun, M.-D. (2005). The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology*, 64(1), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.012>
- Parrish, J. J. (2014). Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- Prieto-Martínez, N., Morató, R., Muiño, R., Hidalgo, C. O., Rodríguez-Gil, J. E., Bonet, S., & Yeste, M. (2017). Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa:

- Identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(6), 1249. <https://doi.org/10.1071/rd16077>
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–248. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., de la Fuente, J., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression¹. *Biology of Reproduction*, 68(1), 236–243. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>
- Sakurai, M., Suzuki, C., & Yoshioka, K. (2015). Effect of knockout serum replacement supplementation to culture medium on porcine blastocyst development and piglet production. *Theriogenology*, 83(4), 679–686.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.003>
- Seidel, G. E., Jr. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, 65(1), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.025>
- Sena-Netto, S. B., Sprícigo, J. F. W., Leme, L. O., Guimarães, A. L. S., Caixeta, F. M. C., Dode, M. A. N., & Pivato, I. (2020). The replacement of fetal bovine serum with bovine serum albumin during oocyte maturation and embryo culture does not improve blastocyst quality after slow freezing cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, 18(3), 171–179. <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0059>
- Singh, R. P., Escobar, E., Wildt, D., Patel, S., Costa, G. M. J., & Pukazhenthil, B. (2019). Effect of sphingosine-1-phosphate on cryopreserved sheep testicular explants cultured in vitro. *Theriogenology*, 128, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.038>
- Stojanov, T., & O'Neill, C. (1999). Ontogeny of expression of a receptor for platelet-activating factor in mouse preimplantation embryos and the effects of fertilization and culture in vitro on its expression¹. *Biology of Reproduction*, 60(3), 674–682. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.3.674>
- Sudano, M. J., Paschoal, D. M., da Silva Rascado, T., Crocomo, L. F., Magalhães, L. C. O., Junior, A. M., Machado, R., & da Cruz Landim-Alvarenga, F. (2012). Crucial

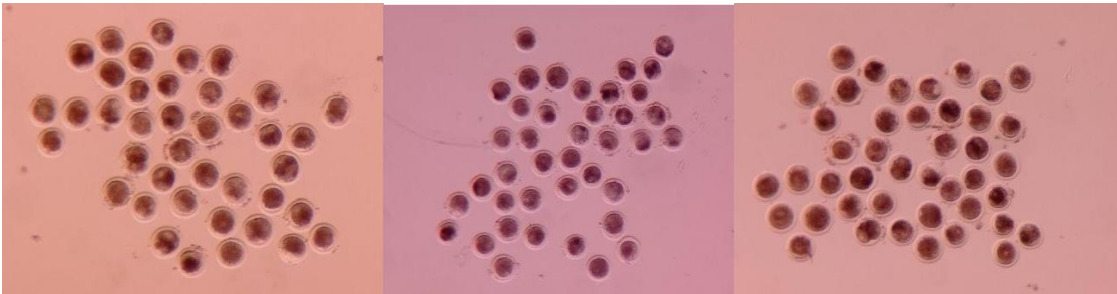
- surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*, 22(2), 124–131. <https://doi.org/10.1017/s0967199412000196>
- Tanghe, S., Van Soom, A., Mehrzad, J., Maes, D., Duchateau, L., & de Kruif, A. (2003). Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology*, 60(1), 135–149. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01360-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01360-2)
- Thompson, J. G., Partridge, R. J., Houghton, F. D., Cox, C. I., & Leese, H. J. (1996). Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Reproduction*, 106(2), 299–306. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060299>
- Tornesi B, J Archer. 1993. Importancia de los componentes de los medios de cultivo en la viabilidad embrionaria. En: I Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal. Córdoba. Argentina.
- Trasorras, V., Giuliano, S., & Miragaya, M. (2013). In vitro production of embryos in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 136(3), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.009>
- Vajta, G., & Nagy, Z. P. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(6), 779–796. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61091-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61091-7)
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053–1063. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
- Vassiliev, I., Vassilieva, S., Beebe, L. F. S., McIlpatrick, S. M., Harrison, S. J., & Nottle, M. B. (2010). Development of culture conditions for the isolation of pluripotent porcine embryonal outgrowths from in vitro produced and in vivo derived embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 56(5), 546–551. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-197a>
- Wang, J., Li, Y., Pan, L., Li, J., Yu, Y., Liu, B., Zubair, M., Wei, Y., Pillay, B., Olaniran, A. O., Chiliza, T. E., Shao, G., Feng, Z., & Xiong, Q. (2021). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) moonlights as an adhesin in Mycoplasma hyorhinis adhesion to epithelial cells as well as a plasminogen receptor mediating extracellular matrix degradation. *Veterinary Research*, 52(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00952-8>
- Wohlres-Viana, S., Boite, M. C., Viana, J. H. M., Machado, M. A., & Camargo, L. S. de A. (2011). Relative expression of mRNAs related to cavitation process in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1),

- 124–128. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982011000100017>
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J. W., & Niemann, H. (1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction and Development*, 53(1), 8–18. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199905\)53:1](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199905)53:1)
- Xiang, D. C., Jia, B. Y., Quan, G. B., Zhang, B., Shao, Q. Y., Zhao, Z. Y., Hong, Q. H., & Wu, G. Q. (2019). Effect of knockout serum replacement during postwarming recovery culture on the development and quality of vitrified parthenogenetic porcine blastocysts. *Biopreservation and Biobanking*, 17(4), 342–351. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0132>
- Yang, M. Y., & Rajamahendran, R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science*, 70(3–4), 159–169. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00186-5)
- Yogalingam, G., Hwang, S., Ferreira, J. C. B., & Mochly-Rosen, D. (2013). Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Phosphorylation by Protein Kinase C δ (PKC δ) Inhibits Mitochondria Elimination by Lysosomal-like Structures following Ischemia and Reoxygenation-induced Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 18947–18960.
- Zhou, J., Bievre, M., & Bondy, C. A. (2000). Reduced GLUT1 expression in Igf1 $^{-/-}$ null oocytes and follicles. *Growth Hormone & IGF Research*, 10(3), 111–117. <https://doi.org/10.1054/ghir.2000.0147>

Anexos



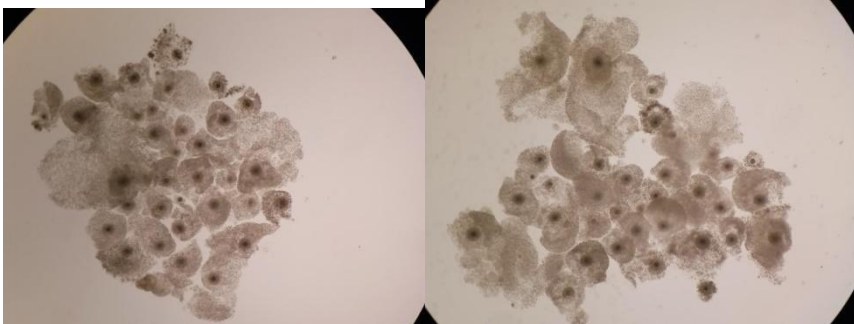
Anexo A. Recuperación de complejos cúmulo ovocitos



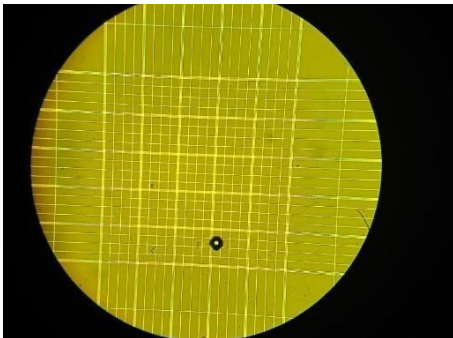
Anexo B. Clasificación de ovocitos



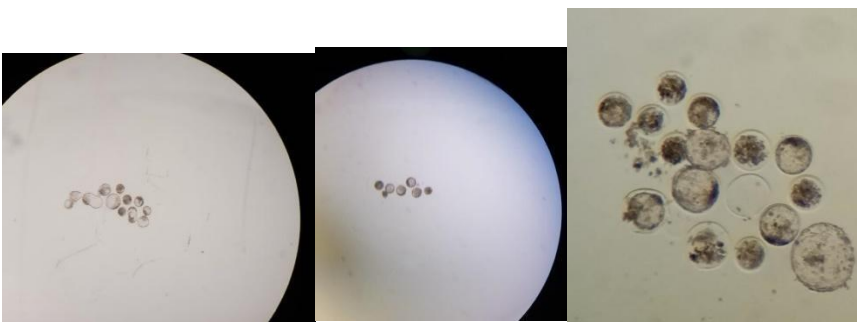
Anexo C. Maduración de ovocitos.



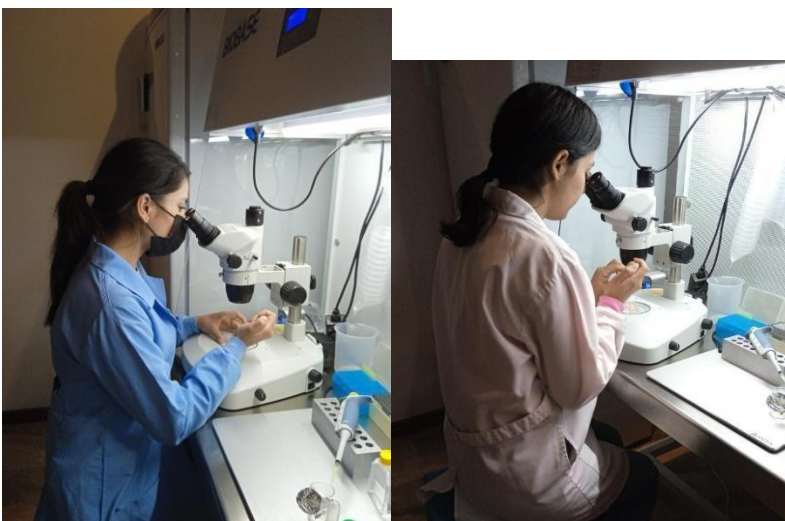
Anexo D. Clasificación de ovocitos pos maduración

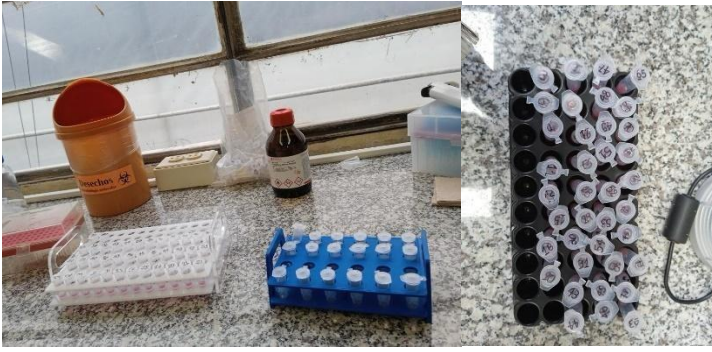


Anexo E. Conteo de espermatozoides.



Anexo F. Clasificación de blastocistos





Anexo G. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario