

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Efecto del Resveratrol y L-carnitina suplementado al medio de maduración
sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos**

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


Autores:

Luis Armando Amay Zatama

Adrián Humberto Quezada Capelo

Director:

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

Cuenca, Ecuador

2024-04-11

Resumen

El resveratrol (RES) y la L-carnitina (LC) son dos aditivos/antioxidantes eficaces para reducir estrés oxidativo y estimular el metabolismo energético de las células. En este sentido, esta investigación evaluó el efecto de la suplementación con LC (0,3 mg/ml), RES (1 μ M) y su combinación (RES+LC= 0,5 μ M + 0,15 mg/ml) al medio MIV de ovocitos sobre la tasa de maduración nuclear (M II) y la tasa de desarrollo embrionario (clivaje y blastocistos) posterior a la fertilización *in vitro* (FIV). Un total de 1209 ovocitos fueron recuperados de ovarios bovinos, y madurados *in vitro* en medio MIV suplementado con LC (n = 304), RES (n = 300), LC+RES (n = 302) y control (n = 303). Después de 24 h de incubación, un lote de 100 ovocitos de cada grupo fueron evaluados la maduración nuclear (MII), y el resto fueron fertilizados y cultivados *in vitro* durante 7 días. Los resultados demostraron que no hubo diferencias significativas en la tasa de MII ($P > 0,05$). La tasa de clivaje fue mayor ($P < 0,05$) en los ovocitos madurados con LC comparados con el control. La tasa de blastocistos fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en los ovocitos madurados con LC que aquellos madurados con LC+RES y control ($39,7 \pm 3,43\%$ vs. $27,2 \pm 3,14\%$ y $30,0 \pm 3,23\%$, respectivamente). En conclusión, la L-carnitina suplementada al medio de maduración de ovocitos bovinos produjo un mejor desarrollo embrionario, mientras que el resveratrol, solo o combinado con L-carnitina, no tuvo un efecto significativo en la producción *in vitro* de embriones bovinos.

Palabras clave: medicina veterinaria, embriones bovinos, blastocistos, ovocitos



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

Resveratrol (RES) and L-carnitine (LC) are two effective additives/antioxidants for reducing oxidative stress and stimulating cellular energy metabolism. Accordingly, this research evaluated the effect of supplementing with LC (0.3 mg/ml), RES (1 μ M), and their combination (RES+LC= 0.5 μ M + 0.15 mg/ml) to the MIV medium of oocytes on the rate of nuclear maturation (MII) and the rate of embryonic development (cleavage and blastocysts) following in vitro fertilization (IVF). A total of 1209 oocytes were recovered from bovine ovaries and matured in vitro in MIV medium supplemented with LC (n = 304), RES (n = 300), LC+RES (n = 302), and control (n = 303). After 24 hours of incubation, a batch of 100 oocytes from each group was assessed for nuclear maturation (MII), and the remainder were fertilized and cultured in vitro for 7 days. The results demonstrated no significant differences in the MII rate ($P>0.05$). The cleavage rate was higher ($P<0.05$) in oocytes matured with LC compared to the control. The blastocyst rate was significantly higher ($P<0.05$) in oocytes matured with LC than those matured with LC+RES and control ($39.7 \pm 3.43\%$ vs. $27.2 \pm 3.14\%$ and $30.0 \pm 3.23\%$, respectively). In conclusion, L-carnitine supplementation to the maturation medium of bovine oocytes resulted in improved embryonic development, whereas resveratrol, either alone or combined with L-carnitine, had no significant effect on the in vitro production of bovine embryos.

Keywords: veterinary medicine, bovine embryos, blastocysts, oocytes



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

1. Introducción	10
Objetivos.....	13
a. Objetivo General	13
b. Objetivos específicos	13
2. Revisión de literatura	14
2.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	14
2.1.1. Maduración <i>in vitro</i>	14
2.1.2. Fecundación <i>in vitro</i>	15
2.1.3. Cultivo <i>in vitro</i>	16
2.2. Obtención de ovarios.....	16
2.3. Complejo cúmulo-ovocito	17
2.4. Importancia de los medios para PIVE	18
2.5. Evaluación y clasificación de embriones bovinos	18
2.5.1. Calidad embrionaria.....	18
2.6. Aditivos y Antioxidantes empleados en PIVE	19
2.7. Especies de oxígeno reactivo.....	19
2.8. Producción de ROS durante la Producción <i>in vitro</i> de Embriones.....	20
2.9. Resveratrol	22
2.9.1. Efecto fisiológico del Resveratrol	23
2.10. L-carnitina.....	23
3. Materiales y métodos	25
3.1. Materiales	25
3.1.1. Materiales físicos	25
3.1.2. Materiales biológicos	26
3.1.3. Reactivos.....	26
3.2 Métodos	27
3.2.1 Elaboración de medios para la Producción <i>in vitro</i> de embriones (PIVE)	28
3.2.2 Diseño experimental	29
3.2.3 Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	29
3.2.4 Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	30
3.2.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	30
3.2.6 Evaluación de maduración nuclear.....	30
3.2.7 Desarrollo embrionario.....	32
3.3 Análisis Estadístico	33

4. Resultados	35
5. Discusión	39
6. Conclusiones	42
7. Recomendaciones	43
Referencias	44
Anexos	53

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación del laboratorio de investigación.....	27
Figura 2. Ovocitos post-MIV	31
Figura 3. Evaluación de maduración nuclear.....	31
Figura 4. Ovocitos inmaduros.....	32
Figura 5. Ovocitos maduros.....	32
Figura 6. Blastocistos en diferentes estadios de desarrollo	33
Figura 7. Estadios embrionarios: A) Blastocisto compacto; B) Blastocisto expandido; C) Blastocisto eclosionando; D) Blastocisto eclosionado.....	33
Figura 8. Porcentaje de ovocitos que alcanzaron la fase meiótica MII después de suplementar el medio MIV con Resveratrol (RES, n = 147), L-carnitina (LC, n = 145), y la mezcla de RES+LC (n = 131). El Control no tuvo aditivos (n = 138)	35
Figura 9. Tasa de clivaje a las 72 horas posterior a la fecundación <i>in vitro</i> de embriones bovinos provenientes de ovocitos madurados <i>in vitro</i> con diferentes aditivos: Control (n = 203) Resveratrol (RES, n = 200), L-carnitina (LC, n = 204), y RES+LC (n = 202). Letras diferentes en cada columna expresan diferencias significativas entre tratamientos a – b, P < 0,05.....	36
Figura 10. Tasa de desarrollo embrionario (blastocistos) a los 8 días posteriores a la fecundación <i>in vitro</i> de embriones bovinos provenientes de ovocitos madurados <i>in vitro</i> con diferentes aditivos: Control (n = 203) Resveratrol (RES, n = 200), L-carnitina (LC, n = 204), y RES+LC (n = 202). Letras diferentes en cada columna expresan diferencias significativas entre tratamientos a – b, P < 0,05.....	37

Índice de tablas

Tabla 1: Medio de Maduración in vitro (medio MIV).....	28
Tabla 2: Medio de Fecundación in vitro (FIV-TL-ST- μ MU, medio FIV).....	28
Tabla 3: Medio Sperm-TALP para la preparación de espermatozoides.....	28
Tabla 4: Medio de Cultivo in vitro (CIV-CR2, medio CIV).....	29
Tabla 5. Producción <i>in vitro</i> de blastocistos bovinos provenientes de ovocitos madurados <i>in vitro</i> con diferentes aditivos: Control, Resveratrol (RES), L-carnitina (LC), y RES+LC. Total de réplicas: 8 sesiones.	37

Agradecimiento

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres y hermanos por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación y toda la etapa de formación académica. También extendiendo un sincero agradecimiento a todas las amistades formadas en la facultad, que me brindaron su apoyo y motivación y de igual manera a quienes conforman la Universidad de Cuenca, en especial a los docentes a quienes considero amigos que con paciencia y profesionalismo supieron impartir y transmitir sus conocimientos durante mi preparación académica.

Luis Amay.

Agradecimiento

Agradezco en primer lugar a Dios, por darme la firmeza para continuar en cada momento de mi caminar. A mis padres por tener la paciencia de guiarme día a día por un futuro prometedor. A mis hermanos por tantas conversaciones y planes a futuro. A mi pareja, Grace, por su amor, paciencia y encanto, eres un pilar fundamental en cada paso y decisión que damos, crecemos juntos.

Adrián Quezada.

Dedicatoria

Este logro lo dedico especialmente a mis padres y hermanos que con su apoyo, amor y confianza me han ayudado a cumplir con este objetivo planteado y a las personas llegaron a formar parte de mi vida durante el desarrollo de mi carrera.

Luis Amay.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a todas las personas que de alguna manera formaron parte de este logro, a las buenas personas que me he encontrado a lo largo de mi carrera, y de las que he aprendido a ser aún mejor.

Adrián Quezada.

Glosario

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AG: Ácidos grasos

AGCL: Ácidos grasos de cadena larga

AMPc: Adenosín Monofosfato cíclico

AMPK: Proteína Quinasa activada por Adenosina Monofosfato

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CC: Células del cúmulo

CIV: Cultivo *in vitro*

COCs: Complejos cúmulo-ovocito

EAA: Aminoácidos esenciales

EGF: Epidermal grow factor

EO: Estrés oxidativo

FIV: Fecundación *in vitro*

FSH: Hormona Foliculoestimulante

IETS: Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud

LC: L-*carnitina*

LH: Hormona luteinizante

MII: Metafase II

MIV: Maduración *in vitro*

MOET: Ovulación múltiple y transferencia de embriones

NAD⁺: Nicotiamida Adenina Dinucleotido

NADPH: Nicotiamida Adenina Dinucleotido Fosfato

OPU: *Ovum Pick Up*

PBS: Buffer fosfato salino

PDEs: Fosfodiesterasas

PGC-1 α : Cofactor 1 α del receptor activado gamma del proliferador del peroxisoma

PIVE: Producción *in vitro* de embriones

RES: Resveratrol

ROS: Especies de oxígeno reactivo

SFB: Suero Fetal Bovino

SIRT1: Sirtuina 1

SOV: Superovulación

P₄: Progesterona

ZP: Zona pelúcida

1. Introducción

Las tecnologías de reproducción asistida más utilizadas en el ganado bovino son la ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) y la producción *in vitro* de embriones (PIVE) (Gallego et al., 2022). Actualmente, la aplicación PIVE en el ganado bovino ha crecido exponencialmente, superándole a la producción *in vivo* de embriones debido a sus beneficios prácticos (Block et al., 2011). La transferencia de embriones bovinos (producidos *in vitro* o *in vivo*) a madres nodrizas supone una de las alternativas más rentables y seguras para el mejoramiento genético a nivel mundial (García et al., 2017). Además, la transferencia de embriones disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades sexuales que causan subfertilidad o infertilidad. Es por ello que la calidad embrionaria dependiendo de su estadio (blastocisto compacto, expandido eclosionando o eclosionado) constituye uno de los factores de mayor importancia para la relación a la supervivencia y/o criosupervivencia (en caso de ser criopreservados) frente a la fertilidad (Bó & Mapletoft, 2018).

El proceso de PIVE incluye la maduración (MIV), fertilización (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV) y éstos a su vez de la composición de los medios. El éxito de la fertilización y desarrollo embrionario depende en gran medida de la maduración ovocitaria (citoplasmática y nuclear). En términos porcentuales, entre un 30 y 40% de ovocitos maduros *in vitro* y fertilizados llegan a la etapa de blastocistos independientemente de su estadio embrionario (Lonergan & Fair, 2008).

Se ha sugerido que el origen folicular y su potencial para desarrollar ovocitos de calidad influye en la tasa de maduración, no obstante, una vez que el ovocito es recuperado mecánicamente para su uso en la PIVE, su desarrollo puede verse limitado y en consecuencia, el desarrollo embrionario post-fertilización puede ser disminuído (Lonergan & Fair, 2008).

Para ello es importante exponer la composición de los medios de MIV y FIV para garantizar una maduración ovocitaria y fertilización de los gametos, respectivamente. Otros factores iatrogénicos o mecánicos influyen en el desarrollo meiótico de ovocitos durante la fase de maduración. El incremento de la producción de ROS (especies de oxígeno reactivo) provocados por la manipulación de ovocitos que afectan los mecanismos antioxidantes, y por ello, la calidad y desarrollo de gametos y embriones (Torres & Urrego, 2019).

Uno de los factores que afecta el desarrollo ovocitario durante su maduración se debe al estrés oxidativo (EO). Cuando existe un desequilibrio del mecanismo natural antioxidante de los gametos durante la PIVE se puede generar un estrés oxidativo (Gupta et al., 2009), de las moléculas de carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, llegando a modificar sus funciones y reduciendo el desarrollo y supervivencia celular (Agarwal et al., 2005). El EO genera efectos negativos sobre la expresión genética, síntesis de proteínas, viabilidad, desarrollo y

señalización molecular de los gametos y embriones (Zullo et al., 2016). Por lo tanto, es imperativo mejorar los medios de maduración *in vitro* con antioxidantes que mitiguen los efectos nocivos de los ovocitos durante su fase de maduración.

El resveratrol (RES) es un polifenol derivado de las uvas, arándanos y las nueces que es conocido por su poderosa acción antioxidante mediante su mecanismo eliminadora de radicales libres y reducción de ROS. El RES parece influir en la maduración de los ovocitos a través de varios mecanismos, incluyendo la regulación de la expresión génica y la protección contra el estrés oxidativo, que puede ser perjudicial para las células en desarrollo (Soliman, 2013). Los beneficios del RES en la PIVE bovinos, suplementándose a los medios de MIV o CIV son; el aumento en la generación de energía (ATP) y reducción de lípidos acumulados en los blastocistos (Soliman, 2013), esto reduce las especies de oxígeno reactivo (ROS), aumenta la lipólisis y reduce la lipogénesis, produce un incremento del glutatión (GSH) y mejora las tasas de desarrollo y criotolerancia embrionaria después de la vitrificación, lo que se asocia con un deterioro del desarrollo y fertilización (Hara et al., 2018). Además, el RES corrige el patrón anormal de la distribución mitocondrial, resultando en una mayor formación y desarrollo de blastocistos y aumento de blastómeros (Y. Wang et al., 2018).

Un estudio realizado por (F. Wang et al., 2014), determina que el RES suplementado al medio de maduración *in vitro* a una concentración de 1 μ M mejora la calidad de ovocitos, pues estimula la secreción de progesterona (P_4) y consecuentemente aumentará el porcentaje y número de blastocistos, en comparación a dosis más elevadas. Las mayores concentraciones de RES suplementado entre 20 y 40 μ M durante la MIV en bovinos, disminuyen con un alto grado de significancia el número de ovocitos que logran alcanzar el estradio de MII (Pocar et al., 2004).

La L-carnitina (LC) es un compuesto que se deriva de dos aminoácidos esenciales, la lisina y metionina. La LC juega un papel importante en el metabolismo de las grasas, ayudando a transportar los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna para su oxidación y generación de energía mediante la oxidación Beta. Se cree que la LC puede actuar como un antioxidante, protegiendo los ovocitos del estrés oxidativo durante su desarrollo. Además, se ha sugerido que la LC podría mejorar la utilización de ácidos grasos como fuente de energía en los ovocitos, lo que podría promover su desarrollo y maduración. Según estudios realizados por (Rahmatullah et al., 2023), la L-carnitina mejora la competencia de los ovocitos y la maduración nuclear al ser suplementada en los medios de MIV a una dosis de 3 mg/ml, aumentando el porcentaje de ovocitos que llegan a la MII, siendo competentes para la FIV, al conocer estos beneficios nos planteamos suplementar esta dosis en el medio MIV. La LC protege la integridad de la membrana mitocondrial y del ADN, en el proceso de

MIV de ovocitos bovinos, la L-*carnitina* que es secretada por células del cúmulo (CC) aumenta al transcurrir el tiempo de maduración y al añadirse al medio MIV, aumenta el porcentaje de supervivencia (Xu et al., 2020).

En base a estos antecedentes nos planteamos la hipótesis de que, al adicionar RES (0,1 μ M), LC (0,30 mg/mL) o su combinación (0,5 μ M de RES + 0,15 mg/mL de LC) al medio de maduración *in vitro*, podría mejorar la respuesta de maduración nuclear de los ovocitos y, en consecuencia, un mejor desarrollo embrionario de blastocistos.

Objetivos

a. Objetivo General

- Evaluar los efectos del resveratrol y L-*carnitina* suplementada al medio de maduración sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos.

b. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del resveratrol, L-carnitina y su combinación suplementados al medio de maduración *in vitro*, sobre la maduración nuclear (metafase II) de ovocitos bovinos.
- Evaluar el efecto del resveratrol, L-*carnitina* y su combinación sobre el desarrollo embrionario y producción de blastocistos.

2. Revisión de literatura

2.1. Producción *in vitro* de embriones bovinos

La PIVE (Producción *in vitro* de embriones), es una técnica útil para mejorar la multiplicación del material genético de manera más eficiente abarcando la combinación de procesos de maduración *in vitro* de ovocitos, capacitación de espermatozoides, fecundación y cultivo *in vitro* (García et al., 2017). La PIVE de embriones bovinos ha obtenido importancia para ser utilizada como una alternativa o combinada con programas de superovulación (SOV) u ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET) debido a la flexibilidad y ventajas que se obtienen (Aguirre et al., 2009).

Uno de los procesos más críticos en la PIVE es lograr con éxito la maduración de ovocitos, por consiguiente, se considera como un factor clave para conseguir aumentar la calidad y proporción de blastocistos (Patrizio et al., 2007). Los parámetros energéticos como actividad mitocondrial y niveles de ATP se encuentran relacionados con una competencia mayor de los ovocitos para el desarrollo embrionario (Gottardi & Mingoti, 2010).

La producción *in vitro* de embriones bovinos en el laboratorio consta de procesos secuenciales: la maduración *in vitro*, fecundación espermática de ovocitos maduros y el cultivo de los presuntos cigotos hasta que alcancen los estadios de blastocistos. En cada una de estas fases se debe cuidar que las condiciones físicas y químicas de los medios empleados sean estrictamente controlados para garantizar la correcta maduración ovocitaria, capacitación e interacción entre gametos y desarrollo embrionario (Gallego et al., 2022).

2.1.1. Maduración *in vitro*

La maduración *in vitro* es el procedimiento contiguo a la recolección y clasificación de COC's, es el proceso en el que los gametos femeninos adquieren la capacidad para ser fertilizados, esto debido a que los óvulos obtenidos son provenientes de folículos en desarrollo (Lonergan & Fair, 2008). Los gametos en fase de MIV finalizan su desarrollo y llegan al estadio de MII, en el cual adquieren su competencia citoplasmática y genética, desde la reacomodación de los túbulos hasta la pérdida del juego de cromosomas (haploides) (Salgado & Lopera, 2020).

Cuando los ovocitos se extraen de los folículos terciarios y son cultivados *in vitro*, el proceso de maduración ocurre tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. La maduración nuclear se produce en forma espontánea y la primera modificación del núcleo que se puede visualizar es la condensación de la cromatina y la ruptura de la vesícula germinativa (Palma, 2011).

La MIV de ovocitos bovinos se ve afectada por una variedad de factores como tiempo y temperatura durante el transporte desde el matadero hasta los laboratorios, el tamaño

folicular, etapa del desarrollo del ovocito, diámetro ovocitario, composición del medio empleado, las hormonas, sueros y el tiempo de maduración. El tiempo inadecuado puede permitir una formación anormal de la cromatina, un envejecimiento celular del ovocito y el desarrollo comprometido (Landínez et al., 2010).

La viabilidad ovocitaria se puede determinar, basándose en un examen visual que nos permita evaluar la integridad de las membranas, la zona pelúcida (ZP), el núcleo y la normalidad del citoplasma, esto nos permite realizar una clasificación morfológica válida (Báez et al., 2009). Durante la MIV, la formación del primer corpúsculo polar nos indica que la maduración ha sido un éxito, llegando a alcanzar la Metafase II (MII), que se produce durante las 18 a 24 horas luego de haber iniciado la maduración. Se ha mostrado que existen evidencias de que algunos COC's maduran tempranamente, mostrando el primer corpúsculo polar a las 16 horas, sin embargo, es necesario un periodo de cultivo antes de la fecundación para que logre alcanzar la capacidad del ovocito para desarrollarse (Landínez et al., 2010).

En óptimas condiciones, cerca del 95% de ovocitos pueden alcanzar la maduración y de ellos cerca del 80% pueden alcanzar el estadio de dos células, no obstante, menos de la mitad llega al estadio de blastocisto, siete días posteriores a la fecundación *in vitro* (FIV) (Ferré et al., 2019). Dentro de la maduración *in vitro*, existen otros importantes factores a tener en cuenta como el soporte físico, adición de aceite mineral, forma de colocación del método de cultivo ya sea en gota o pozo, número de ovocitos por volumen del medio y el movimiento realizado en la sesión (Hatyrnaz et al., 2018).

Entre los sistemas de cultivo para desarrollar la maduración *in vitro* se destacan; el cerrado, en el cual no es permitido el contacto directo con la atmósfera, haciendo uso de una mezcla de gases (recipiente hermético) y el abierto que es realizado manteniendo contiguo un intercambio gaseoso (Smith et al., 2012).

Al ser un procedimiento secuenciado, lograr el éxito de los siguientes procesos de FIV y CIV para el desarrollo embrionario, dependerá del desempeño de los ovocitos madurados *in vitro* que sufrirán cambios nucleares y citoplasmáticos (Lonergan & Fair, 2008).

2.1.2. Fecundación *in vitro*

El procedimiento de fecundación *in vitro*, indica que se realiza dentro de un laboratorio, ello involucra el control de aquellos mecanismos de maduración e interacción entre los gametos masculinos y femeninos en un ambiente artificial con el propósito de producir embriones (Filipiak & Larocca, 2014).

Una vez finalizada la MIV, se incuban los ovocitos junto con los espermatozoides durante 18 – 24 horas mientras se realiza la fecundación *in vitro*. La interacción entre espermatozoides y

ovocitos en la placa de fertilización ocurrirá en un microambiente de $> 400 \mu\text{L}$ para los ovocitos que han sido recolectados en masa dentro de un matadero y de $50 - 100 \mu\text{L}$ para una cantidad baja de ovocitos obtenidos de donantes de OPU (*Ovum Pick Up*) (Ferré et al., 2019). Para esto se incuban junto con los espermatozoides que deben estar previamente capacitados, pero dada la problemática de la utilización de Percoll como gradiente de densidad en la separación de espermatozoides cuyo uso ha sido restringido en algunos países, se ha estudiado sustitutos como *Bovipure*, *Puresperm*, entre otros (Sansiñena & Gasparrini, 2016). El éxito de la FIV reside en la tasa de embriones obtenida, es por ello que se busca reducir los factores que afectan el rendimiento, como los efectos de los ROS que se producen debido al metabolismo celular y las condiciones del medio durante la etapa de división del cigoto y su desarrollo a blastocisto (Quintanilla et al., 2015).

Una importante ventaja de la FIV, es que requiere de una pequeña cantidad de semen para lograr fertilizar los ovocitos previamente madurados, lo que favorece el uso de pajuelas (Ferré et al., 2019).

Se debe distinguir que en la técnica de FIV desarrollada en laboratorios dedicados a la investigación se usan ovarios de hembras que han sido sacrificadas en el matadero por lo que no tienen ningún valor genético mientras que en los programas reproductivos, los embriones bovinos producidos son provenientes de hembras con alto valor genético (Filipiak & Larocca, 2014).

2.1.3. Cultivo in vitro

Al finalizar la etapa de inseminación, se remueven las células del cúmulo de los ovocitos y se proceden a lavar en el medio seleccionado, luego se incluirán en gotas con el medio en aceite mineral para colocar en la estufa (Filipiak & Larocca, 2014). Es necesario continuar desarrollando nuevos medios de cultivo que nos permitan incrementar la eficiencia durante el CIV de embriones bovinos (Sansiñena & Gasparrini, 2016). La modificación de condiciones del cultivo posterior a la fertilización de ovocitos, afecta significativamente la viabilidad y calidad de blastocistos, sin embargo, se consiguen mejoras significativas en el rendimiento de los blastocistos si se mejora la calidad del ovocito que se somete al proceso de maduración *in vitro* (Loneragan & Fair, 2008).

2.2. Obtención de ovarios

Los ovarios pueden obtenerse después del sacrificio de los animales o de la castración de las hembras a través de un ovariótomo. La obtención de los ovarios después de la faena en los mataderos es la forma más comúnmente usada y más económica de obtener ovocitos con

finés de investigación y comerciales, es la que permitió el desarrollo de la PIVE en bovinos y la que dio inicio a la producción de embriones a grandes escalas (Palma, 2011).

2.3. Complejo cúmulo-ovocito

Para realizar la recuperación de los complejos cúmulo-ovocitos existen diferentes técnicas de acuerdo al material utilizado, ya sea de hembras vivas o de ovarios provenientes de mataderos (Filipiak & Larocca, 2014). En la recolección de ovocitos para PIVE de bovinos, el método más simple y más utilizado es la aspiración de COC's directamente con jeringas o con el uso de cánulas conectadas a bombas aspirantes. Los tamaños de las cánulas más usados pueden variar entre 18 y 21G y 2,5 cm de longitud (Palma, 2011).

Los ovocitos y el líquido folicular aspirado se recolectan en tubos estériles y se deja decantar al menos 10 minutos. Salvo en el caso de aspiración por jeringa, para recolectar COC's con ayuda de bombas aspirantes es fundamental regular la presión con la que se realiza la aspiración, esta se expresa en mmHg. La presión deberá establecerse en función del largo de la tubería, pues sus paredes y la presión negativa empleada, pueden producir efectos traumáticos en los ovocitos aspirados. (Palma, 2018).

Es recomendable una presión de 90 – 150 mm Hg o 20 a 40 ml de flujo/min, cuando se aspira haciendo uso de jeringas es recomendable un volumen de 5 a 10 ml y los ovocitos recuperados se colocan directamente en un tubo o en la Placa Petri siguiendo el proceso de decantación y el sobrenadante se elimina con ayuda de pipeta de Pasteur. Al colocar el líquido folicular en la placa Petri, debe permanecer tapado todo el tiempo que no se esté realizando la búsqueda de COC's para evitar posibles contaminaciones (Stroebech et al., 2015). Es importante tener en cuenta que la excesiva exposición de los ovocitos a temperatura ambiente provoca la formación de redes de fibrina entre ovocitos, lo que inutilizará la placa. La eficiencia en la punción y aspiración folicular basada en la cantidad de ovocitos obtenidos varía de acuerdo a la experiencia del operador y al tamaño de ovarios, estos valores varían entre el 50 y 60% (Filipiak & Larocca, 2014).

Es esencial la calidad de ovocitos en la eficacia de la MIV y está determinada desde la recolección por la calidad y cantidad de células del cúmulos adyacentes, así como por la calidad del núcleo y citoplasma (Wei et al., 2022). Lo que más se valora en las células del cúmulo es la cantidad de capas y su posición, lo ideal es que se encuentren rodeando completamente la ZP (zona pelúcida) del ovocito. El citoplasma debe tener homogeneidad en cuanto a su coloración marrón, por lo que las alteraciones en este a tonalidades más claras u oscuras, serán criterios para el descarte asociados a degeneración y picnosis, entre otros (Boni et al., 2002).

2.4. Importancia de los medios para PIVE

Con el aumento en la implementación de la PIVE a nivel mundial, existe un enfoque mayor en optimizar la calidad y el rendimiento de los blastocistos. Así mismo, el énfasis en restricciones regulatorias relativas a la exportación e importación de embriones cultivados en medios que tengan suero de origen animal, debido al alto riesgo de propagación de agentes patógenos, ha incrementado el deseo de tratar de excluir estos sueros de los medios para la PIVE (Ferré et al., 2019). Aunque el uso de embriones producidos in vitro haya ido en crecimiento en todo el mundo, aún existe la necesidad de mejorar la calidad y el rendimiento con la finalidad de aumentar la tasa de preñez y conseguir la ultracongelación para realizar transferencia directa de embriones. Además, en la actualidad encontramos en el mercado opciones limitadas relativas a los medios de cultivo formulados especialmente y sin suero que logran cumplir con los reglamentos y normas internacionales definidas por la IETS (Stroebech et al., 2015).

La mayoría de laboratorios dedicados a la PIVE de bovinos comerciales y con fines de investigación preparan internamente sus propios medios de cultivo (Wei et al., 2022).

2.5. Evaluación y clasificación de embriones bovinos

La evaluación y clasificación embrionaria es indispensable en la PIVE, el manual IETS indica que los embriones deben clasificarse de acuerdo a un sistema de 1-9 puntos para determinar la etapa del desarrollo en la que se encuentra y un sistema de 1-4 puntos para determinar la calidad embrionaria. Los embriones de grado 1 sobreviven bien a la congelación-descongelación y son recomendables para la comercialización internacional, los de grado 2 y 3 deben ser transferidos frescos a los recipientes adecuados (Bó & Mapletoft, 2018).

La evaluación de embriones se realiza a través de un microscopio estereoscópico, es necesario evaluar la zona pelúcida que debe ser uniforme, no presentar grietas ni colapsos, el diámetro total que oscila entre 150 a 190 μm . El embrión ideal es esférico y compacto, los blastómeros deben tener un tamaño similar y textura y color uniformes (Bó & Mapletoft, 2018). El citoplasma no tendrá que ser vesiculado ni granular y el espacio perivitelino no debe contener restos celulares y estar despejado (Ferré et al., 2019). El mejor predictor para determinar la viabilidad embrionaria es la fase de desarrollo en relación con un día determinado posterior a la ovulación (Bó & Mapletoft, 2018)

2.5.1. Calidad embrionaria

La International Embryo Technology Society (IETS 2009), categoriza los embriones de la siguiente manera:

Grado 1 (Excelente o bueno): Estos embriones son denominados transferibles, tienen la masa celular esférica y simétrica, blastómeras uniformes en color, tamaño y densidad. El embrión será consiente con la etapa del desarrollo, las irregularidades tienen que ser menores y al menos un 85% de material celular debe encontrarse intacto. La ZP debe ser lisa y no presentar irregularidades que facilitarían que el embrión pueda adherirse a las pajuelas.

Grado 2 (Aceptables o regulares): Este tipo de embriones son considerados transferibles, pero no son aptos para congelación. Presentan moderadas irregularidades en la masa embrionaria o en la densidad, color y tamaño de células individuales. La masa embrionaria debe permanecer intacta al menos en un 50% y la supervivencia de estos a la congelación-descongelación es menor en relación a los embriones de grado 1, sin embargo, las tasas de preñez que se obtienen son las adecuadas si los embriones son transferidos en fresco a las adecuadas receptoras.

Grado 3 (Malos): Presentan irregularidades en el tamaño y forma de la masa embrionaria y en el color, densidad y tamaño de las blastómeras, la masa embrionaria debe ser intacta en al menos un 25%. Esta clase de embriones no sobreviven a procesos de congelación-descongelación y las tasas de preñez son inferiores a las que se obtiene con embriones del grado 2 si son transferidos en fresco a las receptoras.

Grado 4 (Muertos o degenerados): Pueden ser embriones u ovocitos que no son viables y se recomienda descartarlos (Bó & Mapletoft, 2018),

2.6. Aditivos y Antioxidantes empleados en PIVE

Los antioxidantes con función biológica se definen como aquella sustancia que reduce o evita que se oxide el sustrato resultando ser un agente reductor de mayor potencia (Ortega et al., 2003). A pesar del sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático con el que cuentan las células, existen algunas moléculas antioxidantes que han sido empleadas como suplemento en medios de cultivo para lograr reducir la producción de especies de oxígeno reactivo en los gametos y embriones, con la finalidad de mejorar su potencial reproductivo mediante la reducción de ROS intracelular, protegiéndolos así del daño que se genera en el ADN y otras biomoléculas. Por consiguiente, se mejora la competencia del desarrollo embrionario (Torres & Urrego, 2019).

2.7. Especies de oxígeno reactivo

Los ROS son átomos o moléculas con un número impar de electrones de valencia (Agarwal, Durairajanayagam, et al., 2014). Son extremadamente reactivos y actúan en reacciones en cadena haciendo que otras moléculas se vuelvan inestables, generando aún más radicales libres (Torres & Urrego, 2019). Comprenden moléculas reactivas que son derivadas de

oxígeno de radicales libres y radicales no libres, constantemente se generan como parte de la normal vida aeróbica durante los pasos intermedios de reducción de oxígeno en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y también se forman como intermediarios necesarios en diversas reacciones enzimáticas (Agarwal, Virk, et al., 2014).

Los ovocitos, espermatozoides y embriones para obtener energía dependen de la fosforilación oxidativa producida en la mitocondria celular, este proceso se acompaña posteriormente de la generación de ROS (Agarwal, Durairajanayagam, et al., 2014).

2.8. Producción de ROS durante la Producción *in vitro* de Embriones

Algunos procesos celulares en el tracto reproductivo son regulados por ROS, que actúan como segundos mensajeros, produciendo respuestas celulares específicas (Shkolnik et al., 2011). Existen algunas macromoléculas sensibles a sufrir modificaciones redox (quinasas, factores de transcripción, fosfatasas) que son importantes en el desarrollo celular, como proliferación, diferenciación y muerte (Covarrubias et al., 2008). Con relación a esta última, los niveles de ROS ocasionan varios tipos de muerte en las células, las concentraciones bajas producen apoptosis, las intermedias producen autofagocitosis y las elevadas concentraciones producen la necrosis celular (Hernández et al., 2010). Durante la MIV, los niveles fisiológicos de ROS son necesarios para reiniciar la meiosis de los ovocitos, para la liberación de calcio Intracelular en el ovocito y para la estimulación de la quinasa activada por nitrógeno (Morado et al., 2009).

En relación a los espermatozoides, se requieren niveles fisiológicos de ROS para su capacitación, hiperactivación y reacción del acrosoma (Jin & Yang, 2017). Concentraciones bajas de ROS se requieren para promover el flujo del colesterol, producción de AMPc, hiperactivación y fusión espermatozoide-ovocito (Gangwar & Atreja, 2015). En contraste, el exceso de estos afecta el funcionamiento de espermatozoides, debido a la peroxidación lipídica, alteraciones en la función mitocondrial, interacción con la ZP, reducción de motilidad y efecto deletéreo sobre el ADN espermático, comprometiendo su fertilidad (Henkel, 2011).

El funcionamiento normal de los espermatozoides, como la maduración, capacitación, hiperactivación, reacción acrosómica y fusión de los ovocitos, son por niveles fisiológicos de ROS, sin embargo, el exceso de los mismos perjudica su funcionalidad (Ortega et al., 2003), pues son susceptibles al estrés oxidativo debido a que en sus membranas celulares presentan ácidos grasos poliinsaturados, lo cual los hace más vulnerables al daño producido por el oxígeno y la peroxidación de lípidos (Torres & Urrego, 2019).

In vitro, existen dos principales factores que contribuyen a la generación y acumulación de ROS: la exposición de gametos y embriones a ambientes estresantes y la ausencia de los mecanismos endógenos de defensa, por ello, las especies de oxígeno reactivo provienen de

fuentes endógenas y exógenas (Agarwal, Durairajanayagam, et al., 2014). Endógenas, en las que los espermatozoides, ovocitos y embriones pueden inducir la acumulación mediante varias rutas metabólicas y enzimáticas, principalmente se incluyen la fosforilación oxidativa, xantina oxidasa y NADPH oxidasa (Guérin et al., 2001). Las fuentes exógenas incluyen a factores ambientales tales como: criopreservación, concentración de oxígeno, luz, medio de cultivo y fuente de energía (Alikani et al., 2002).

Un 5% de Oxígeno (O₂) usado en un cultivo *in vitro* favorece la competencia para la celularidad, expresión genética y desarrollo embrionario relacionado con el EO (Balasubramanian et al., 2007). Sin embargo, las altas concentraciones de O₂ (20% en el aire), aumenta los niveles de ROS, reduciendo el porcentaje de desarrollo embrionario, al producir daños en el ADN, arresto en el desarrollo, peroxidación lipídica y apoptosis (Karagenc et al., 2004)

Los medios de cultivo, dependiendo de la composición y suplementos utilizados, contribuye a la producción de ROS en el sistema de PIVE (Combelles et al., 2009). Al suplementar con fluidos biológicos como suero fetal bovino (SBF) aumenta los niveles de ROS en relación con la suplementación de albúmina sérica bovina (BSA) (Stites et al., 2000). La enzima amino oxidasa en el suero genera el peróxido de hidrógeno como producto secundario, lo cual explica el efecto de la concentración en el suero sobre la criotolerancia, porcentaje de apoptosis y patrón de expresión genética en los embriones (Sudano et al., 2011), sin embargo, este suplemento aumenta la tasa de producción y calidad de embriones (Almeida et al., 2011). Para mantener la competencia de los ovocitos bovinos durante la MIV, se debe regular la concentración de glucosa, pues los elevados niveles de esta en el medio de maduración incrementan los ROS y reducen el contenido de glutatión (GSH) intracelular, inhibiendo a enzimas responsables de la síntesis del GSH, afectando la capacidad de los ovocitos para reducir los radicales libres (Krisher et al., 2007).

También la luz visible induce la producción de ROS, produciendo la oxidación de bases, quiebres de las cadenas de ADN y daños oxidativos en otras biomoléculas (R. Li et al., 2014). Se ha determinado que una excesiva producción de ROS en embriones producidos *in vitro* se atribuye a la exposición transitoria a la luz visible que comúnmente se usa en los laboratorios, reflejándose en el aumento en el índice de apoptosis en blastocistos. Esto nos sugiere que los embriones y medios de cultivo deben protegerse de la luz durante la PIVE en bovinos (Takenaka et al., 2007).

El protocolo para preparación y capacitación de semen para FIV necesita el uso de centrifugación. Sin embargo, la fuerza y el tiempo necesario para este proceso contribuyen en el aumento de niveles de ROS, ocasionando daño oxidativo y afectando la viabilidad de los

espermatozoides (Will et al., 2011). Se ha observado que la centrifugación por periodos de tiempo largos genera daños y pérdida de la integridad en la membrana citoplasmática y fragmentación en el ADN celular (Lampiao, 2012)

La criopreservación genera un aumento significativo de la producción de ROS en los espermatozoides, afectando la viabilidad, motilidad, capacitación y aumentando la peroxidación lipídica en la membrana espermática, reduciendo la capacidad de fertilizar (Bilodeau et al., 2000). En los ovocitos criopreservados, las tasas bajas de fertilización están relacionados con daños por congelación, incluye el endurecimiento de la ZP por la prematura liberación de los gránulos corticales, desorganización del huso y aglutinación o pérdida de los microtúbulos. Debido a esto, el uso de antioxidantes es un importante factor para mejorar el rendimiento antes, durante y después de realizar criopreservación (Hwang & Hochi, 2014).

2.9. Resveratrol

El RES promueve la maduración *in vitro* de los ovocitos y el desarrollo de los embriones bovinos. Al adicionar resveratrol en un medio de cultivo se mejora la calidad de PIVE y además aumenta la resistencia al daño producido durante el proceso de criopreservación (F. Wang et al., 2014)

El resveratrol (RES) es un polifenol natural encontrado en diversas plantas y frutas como moras, arándanos, cacahuates, uvas y vino tinto. La síntesis del mismo se debe a la presencia de factores estresantes de la planta como la contaminación fúngica o radiación UV (Gambini et al., 2013). Presenta características fisicoquímicas tales como: peso molecular de 228,25 g/mol, punto de fusión de 253 y 255 °C, es un polvo sólido de color blanco, es fotosensible al pH y la presencia de isómeros Cis y Trans (Restrepo et al., 2019).

El RES 3,5,4-trihidroxiestilbeno, se sintetiza a través de la catálisis de resveratrol sintasas (RS:EC 2.3.1-95) usando 1 molécula de cumaroil-CoA y 3 moléculas de malonil-CoA. La actividad y su síntesis son inducidas como respuesta a infecciones producidas por patógenos, por ello pertenece al grupo de las fitoalexinas naturales, es decir tienen la capacidad de inhibir procesos infecciosos (Chung et al., 2003).

Debido a las propiedades antioxidantes es utilizado en la PIVE de bovinos, ha sido usada como suplemento en los medios de MIV y CIV, generando un aumento de energía (ATP) y disminuyendo los lípidos acumulados en los blastocistos (Soliman, 2013). Ha sido determinado que con la suplementación de RES a una concentración de 1 μM en el medio para maduración *in vitro* mejora la calidad de los ovocitos debido a que estimula la secreción de progesterona (P4) y por consiguiente aumenta el número y tasa de las células de blastocistos (F. Wang et al., 2014) en comparación con 10 μM de concentraciones adicionada al medio. Al utilizar dosis más elevadas de RES suplementado a 20 μM y 40 μM en el medio

de MIV bovina, se disminuye significativamente la cantidad de ovocitos que logran alcanzar el estadio de Metafase II (MII) (Pocar et al., 2004).

2.9.1. Efecto fisiológico del Resveratrol

El efecto fisiológico de RES, está relacionado a la capacidad que posee para potenciar los procesos celulares que dependen de la Sirtuina 1 (SIRT 1), esta se encuentra relacionada a la Proteína Quinasa activada por Adenosina Monofosfato (AMPK) (Price et al., 2012), la cual es un sensor energético que puede controlar el metabolismo celular, incluyendo la oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa (Kulkarni & Cantó, 2015). La activación de la AMPK mediante el RES aumenta los niveles de NAD⁺, cofactor de SIRT 1, lo que reduce los procesos de acetilación de sustratos de SIRT 1 y activa el cofactor 1 α del receptor activado gamma del proliferador del peroxisoma (PGC-1 α) (Chang & Guarente, 2014).

Un mecanismo propuesto es que el RES activa la AMPK mediante la inhibición competitiva de las fosfodiesterasas (PDEs), aumentando los niveles de la AMPc (Park et al., 2012). Juega un papel muy importante este segundo mensajero en la maduración de los ovocitos de los mamíferos, el cual se genera posterior a la unión de LH Y FSH a los receptores específicos en la membrana citoplasmática de las células de la granulosa, por activación de la enzima Adenilato ciclasa (Mayes & Sirard, 2002).

Los niveles de AMPc intracelular son regulados por las PDEs, que hidrolizan a 5'-AMP. La utilización de inhibidores de las PDEs, ocasionan un retraso en el reinicio de la Meiosis y la cinética más lenta para lograr la expansión de las células del cúmulo, esto prolonga el mantenimiento de uniones GAP entre las células del cúmulo y el ovocito (Thomas et al., 2004). Esta prolongación durante una maduración *in vitro* en presencia de los inhibidores de PDEs puede permitir el paso de los iones, metabolitos, aminoácidos y nucleótidos que mejoran la maduración citoplásmica de los ovocitos, aproximándose así a una sincronización entre la maduración citoplasmática y nuclear, lo cual es bastante favorable para la PIVE y la calidad de los blastocistos (Sirard et al., 2006)

2.10. L-carnitina

La L-carnitina es molécula pequeña soluble en H₂O que desempeña un importante papel en el metabolismo de grasas, es esencial en la oxidación mitocondrial de AG y excreción de ésteres de acil-CoA (acil-coenzima A) (Jaramillo et al., 2019). Protege la membrana y ADN celular contra los daños inducidos por ROS y es fundamental en la oxidación de AGCL (Ácidos grasos de cadena larga) que aumentan la energía en la célula (Zhou et al., 2007).

La disfunción de la mitocondria puede producir una desintoxicación incompleta de ROS, lo cual produce daño oxidativo en las macromoléculas como proteínas, lípidos y ADN (Mishra et

al., 2016). La LC tiene una actividad de eliminación de ROS y la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica y eliminar al anión superóxido, confiriendo protección contra los daños que induce el superóxido de hidrógeno (Torres & Urrego, 2019).

La *L-carnitina* es un aditivo que resulta de la síntesis de dos aminoácidos esenciales (EAA), la lisina y la metionina. Este aditivo ha sido empleado para promover la competencia de los ovocitos para PIVE (Xu et al., 2020). El efecto benéfico de la LC, radica en que facilita el transporte de los ácidos grasos (AG), durante el proceso de β -oxidación mitocondrial para la producción de energía intracelular en forma de adenosin trifosfato (ATP), promoviendo así una mejor calidad de los ovocitos ya que la capacidad de los mismos para generar ATP está correlacionado con una mejor competencia de desarrollo ovocitario y de embriones (Rahmatullah et al., 2023).

La LC ejerce un muy importante efecto antioxidante, promoviendo múltiples mecanismos para la protección de los ovocitos y embriones que se encuentran en desarrollo (Abdelrazik et al., 2009), suplementada a una concentración de 0,3 mg/mL en un medio para maduración in vitro muestra mejores tasas de maduración nuclear en ovocitos de bovinos (Rahmatullah et al., 2023)

En relación a los espermatozoides, la LC influye en la motilidad, puede proteger la membrana plasmática con un alto nivel de AG insaturados (Aliabadi et al., 2012). Existe un aumento en la motilidad de espermatozoides al cambiar el metabolismo de AG, (Abdelrazik et al., 2009). La LC actúa como tampón ajustando la concentración de Acetil-CoA, cuya presencia es esencial en el ciclo del ácido tricarbóxico y producción de ATP (Mishra et al., 2016).

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales físicos

- Incubadora de CO₂ (Memmert, INC 108, Alemania)
- Cámara triple gas (Memmert, IC050, Alemania)
- Refrigerador (Haceb, NEV AS 388L, México)
- Cámara de Flujo Laminar (BioBase BBS-SDC, China)
- Microscopio de contraste de fases y fluorescencia (Nikon Eclipse Ci-E, contraste de fase negativo [Ph1] con filtro verde; Nikon Instruments, Inc., Nueva York)
- Dispositivo para calentamiento (STC-3008I, no patentado)
- Osmómetro (Löser, typ 15, Alemania)
- Balanza de precisión (Boeco, Bas 31 plus, Alemania)
- Microscopio de campo claro
- Cámara de Neubauer (MARIENFELD, Alemania)
- Platina térmica
- Estufa (Memmert, Alemania)
- Baño María (Memmert, W350, Alemania)
- Termo de transporte (2 litros)
- Microcentrífuga (Hettich, Mikro 200, Alemania)
- Termómetro digital (WMETER, TP101, China)
- Pipetas automáticas (BOECO®, Alemania)
- Filtros estériles (NEST, PES Syringe Filters, Nest Scientific USA Inc.)
- Puntas de pipetas de 20, 50 y 1000 µL
- Tubos Falcon de 15 mL
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Papel aluminio
- Papel secante

- Portaobjetos
- Cubreobjetos estériles
- Pinzas y tijeras quirúrgicas
- Vasos de precipitación
- Cajas Petri de 35 y 90 ml
- Guantes
- Marcadores indelebles de punta fina
- Cajas de búsqueda cuadrículadas
- Jeringas de 10, 20 y 50 ml NILPRO
- Agujas 18 G
- Vasos de precipitación
- Vórtex
- Caja portadora de portaobjetos
- Esmalte transparente

3.1.2. Materiales biológicos

- Ovarios bovinos provenientes del camal de Cuenca (EMURPLAG)
- Pajuelas de semen bovino (Alta LIAISON-ET)

3.1.3. Reactivos

- Medio de maduración *in vitro* (MIV)
- Medio de Fecundación *in vitro* (FIV-TL-ST- μ MU)
- Medio de Cultivo *in vitro* (CIV-CR2)
- Medio Sperm-TALP para preparación de espermatozoides
- Cloruro de sodio (Suero fisiológico)

- Lactato de Ringer + alcohol de polivinilo
- Nitrógeno gaseoso y líquido
- Gentamicina
- Percoll
- H-SOFT
- Hialuronidasa
- Medio de fijación (Formaldehido al 2%)
- Medio de tinción (HOECHST)
- Medio de montaje

3.2 Métodos

La recolección de ovarios bovinos se realizó en el camal municipal de la ciudad de Cuenca (EMURPLAG), en suero fisiológico con Gentamicina a una temperatura entre 35°C y 37°C, para posteriormente ser transportados en un lapso de tiempo menor a 2 horas después del sacrificio de los animales hacia el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, ubicado en la Granja Irquis (Latitud: -3.0801834; Longitud. -79.0753254), ubicado en la Parroquia Victoria de Portete, a una altitud de 2663 msnm y una temperatura promedio de 8 °C.



Figura 1. Ubicación del laboratorio de investigación

3.2.1 Elaboración de medios para la Producción *in vitro* de embriones (PIVE)

La elaboración y formulación de todos los medios para la PIVE (Maduración, Fecundación y Cultivo *in vitro*) se exponen en las Tablas 1 – 4. Los diluyentes y medios fueron preparados en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, haciendo uso de químicos de grado reactivo que fueron adquiridos en Sigma – Aldrich Chemical Co.

Tabla 1: Medio de Maduración *in vitro* (medio MIV)

Reactivo	Concentración
TCM 199 -Earle's salt	-
SFB	10% (v/v)
Piruvato de sodio	0,2 Mm
FSH	25 µg/MI
LH	5 µg/MI
Gentamicina	50 µg/MI
L-glutamina	2 Mm
Cisteamina	100 25 µM
Estradiol	2 µg/MI

Tabla 2: Medio de Fecundación *in vitro* (FIV-TL-ST- µMU, medio FIV)

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	114 Mm
Cloruro de potasio	3,2 Mm
Fosfato de sodio monobásico	0,3 Mm
DL-Lactato de sodio	10 Mm
Cloruro de calcio dihidratado	2 Mm
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,5 Mm
Bicarbonato de sodio	25 Mm
SUPLEMENTO DE MEDIO FIV	
BSA	6 mg/MI
Piruvato de sodio	0,2 Mm
Heparina	20 µg/MI
Gentamicina	50 µg/MI

Tabla 3: Medio Sperm-TALP para la preparación de espermatozoides

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	100 Mm
Cloruro de potasio	3,2 Mm
Fosfato de sodio monobásico	0,3 Mm
DL-Lactato de sodio	21,5 Mm
Cloruro de calcio dihidratado	2 Mm
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,4 Mm
HEPES acid free	10 Mm
Bicarbonato de sodio	25 Mm
SUPLEMENTO DE MEDIO Sperm-Talp	
BSA	6 mg/MI
Piruvato de sodio	1 Mm

Gentamicina

50 µg/ml

Tabla 4: Medio de Cultivo *in vitro* (CIV-CR2, medio CIV)

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	108 mM
Cloruro de potasio	3 mM
Bicarbonato de sodio	25 mM
L-Lactato de calcio hidrato	2,5 mM
Piruvato de sodio	4 mM
BME	X2
MEM	X1
Glutamina	0,02 mM
Estreptomina	0,1 mg/mL
Penicilina	100 U/mL
SUPLEMENTO DE MEDIO CIV-CR2	
BSA	5 mg/mL
Alanina	1 Mm
Glicina	1Mm
SFB	3% (v/v)

3.2.2 Diseño experimental

Esta investigación incluyó 4 tratamientos según la suplementación de aditivos-antioxidantes al medio de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos:

- Tratamiento 1: Control (sin suplementar)
- Tratamiento 2: Resveratrol (RES, 1 µM)
- Tratamiento 3: L-carnitina (LC, 0,3 mg/mL)
- Tratamiento 4: Combinación de Resveratrol + L-carnitina (RES+LC, 0,5 µM + 0,15 mg/ml, respectivamente)

Este exéimto constó de dos fases; la primera fase evaluó el efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la maduración nuclear (metafase II). Para ello. Los ovocitos bovinos se sometieron a maduración *in vitro* durante 24 horas y al menos 100 ovocitos por cada tratamiento en seis sesiones.

En la segunda fase, se evaluó el efecto de los tratamientos sobre los ovocitos madurados *in vitro* y entonces fertilizados y cultivados *in vitro* durante 7 días. Esta evaluación se realizó en base al porcentaje de clivaje y blastocistos. Ocho sesiones de PIVE y al menos 200 COC's previamente madurados *in vitro* se usaron para este fin.

3.2.3 Maduración *in vitro* (MIV)

Los ovarios bovinos procedentes del camal de la ciudad de Cuenca, se transportaron al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal en suero fisiológico con gentamicina

a una temperatura de entre 35 y 37°C en un tiempo menor a 2 horas después de su sacrificio. La punción folicular, búsqueda y clasificación de COC's se realizará en las instalaciones y con equipos del laboratorio. Los ovocitos fueron clasificados como aptos para FIV según las capas de células de la granulosa (> 3capas), zona pelúcida intacta y el citoplasma homogéneo. Los ovocitos aptos fueron agrupados en grupos de 25 COC's colocados en microgotas de 60 µL de medio MIV suplementado con los tratamientos (control, RES, LC, RES+LC) dentro de una caja de 35 mm y sometidos a un ambiente de maduración *in vitro* equivalente al 6% de CO₂ y humedad máxima durante 24 horas.

3.2.4 Fecundación *in vitro* (FIV)

La sesión de FIV, se realizó preparando a los espermatozoides bovinos congelados /descongelados en el medio Sperm-TALP (Suplementado) al menos 30 minutos previos a la FIV. Para la selección espermática se utilizó columnas de Percoll en porcentajes de 90 y 45% montadas en un tubo cónico Eppendorf de 1.5 ml, que posteriormente junto con el semen se sometieron a centrifugación a 500 revoluciones durante 15 minutos, luego el pellet obtenido se volvió a centrifugar con 1 ml del medio Sperm-TALP durante 5 minutos a 300 revoluciones y finalmente se eliminó el excedente para agregar 60 µL de Sperm-TALP, esto nos permite evaluar la viabilidad y concentración de espermatozoides. Grupos de 25 ovocitos madurados *in vitro* se colocaron en microgotas con un volumen de 60 µL con el medio FIV y a estos se procedió a inseminar con espermatozoides de cada grupo utilizando una concentración final de 1×10^6 esp/mL en la incubadora con el 6% de CO₂ y humedad máxima durante 24 horas.

3.2.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Los presuntos cigotos serán sometidos a vórtex durante 2 minutos con el objetivo de quitar las células del cúmulo que los rodean y serán colocados a cultivar *in vitro* (CIV) dentro de una cámara triple gas con CO₂ al 6%, Nitrógeno en un 5% y O₂ y con humedad máxima. El clivaje será evaluado a las 72 horas posteriores a la FIV y la producción y desarrollo de blastocistos se evaluarán al día 7 post-FIV. Finalmente la calidad de blastocistos obtenidos se realizará de acuerdo a lo detallado por (Bó & Mapletoft, 2018).

3.2.6 Evaluación de maduración nuclear

Después de las 24 horas de maduración *in vitro* los grupos de ovocitos proveniente de los cuatro tratamientos fueron colocados en 2 ml de PBS dentro de un tubo cónico de 15 ml y entonces agitados en el vórtex durante 2 minutos para desprender las células del cúmulo. Una vez recuperadas las estructuras, fueron colocadas en un primer pocillo de 500 µl con PBS que contenía formaldehído al 2% durante 15 minutos. Consecuentemente, los ovocitos fijados fueron colocados en un segundo pocillo que contenía PBS durante 5 minutos para el lavado.

Luego de ese tiempo, los ovocitos fueron transferidos a un tercer pocillo que contenía el fluorocromo Hoechst y en oscuridad y refrigeración se mantuvieron durante 15 minutos. Finalmente, los ovocitos fueron trasladados a un cuarto pocillo con PBS para un segundo lavado, esto se realizó en ausencia de la luz. Finalizado este proceso, los ovocitos fueron montados en microgotas de 2 μ l de medio de montaje y sellados con un cubreobjetos y esmalte. La evaluación se realizó en un microscopio de epifluorescencia con el filtro UV a una emisión de 320 nm y excitación de 400 nm. Se observó la cantidad de ovocitos que alcanzaron la etapa meiótica de metafase II (MII), de acuerdo a la disposición de cromosomas.

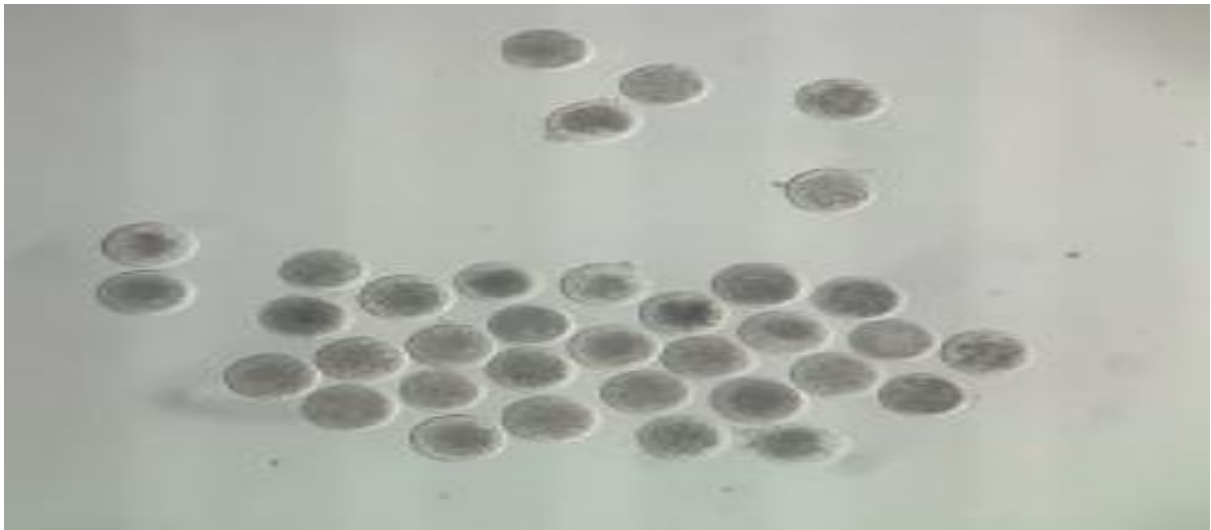


Figura 2. Ovocitos post-MIV

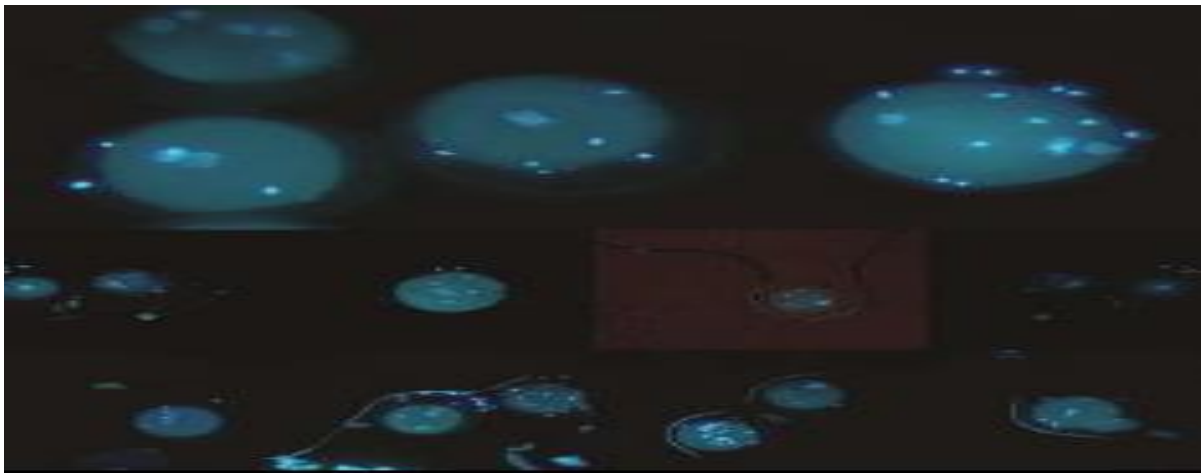


Figura 3. Evaluación de maduración nuclear



Figura 4. Ovocitos inmaduros



Figura 5. Ovocitos maduros

3.2.7 Desarrollo embrionario

Al transcurrir 72 horas posteriores a la fecundación *in vitro* se evaluó la tasa de clivaje, con el uso de un estereoscopio se observó las estructuras totales y el número de clivados, obteniéndose el porcentaje de cada tratamiento. La producción de blastocistos se realizó al día 7 post-FIV, se determinó el número de embriones y los diferentes estadios en los que se encontraban y en relación al número de estructuras totales se obtuvo la tasa de blastocistos producidos en la investigación.

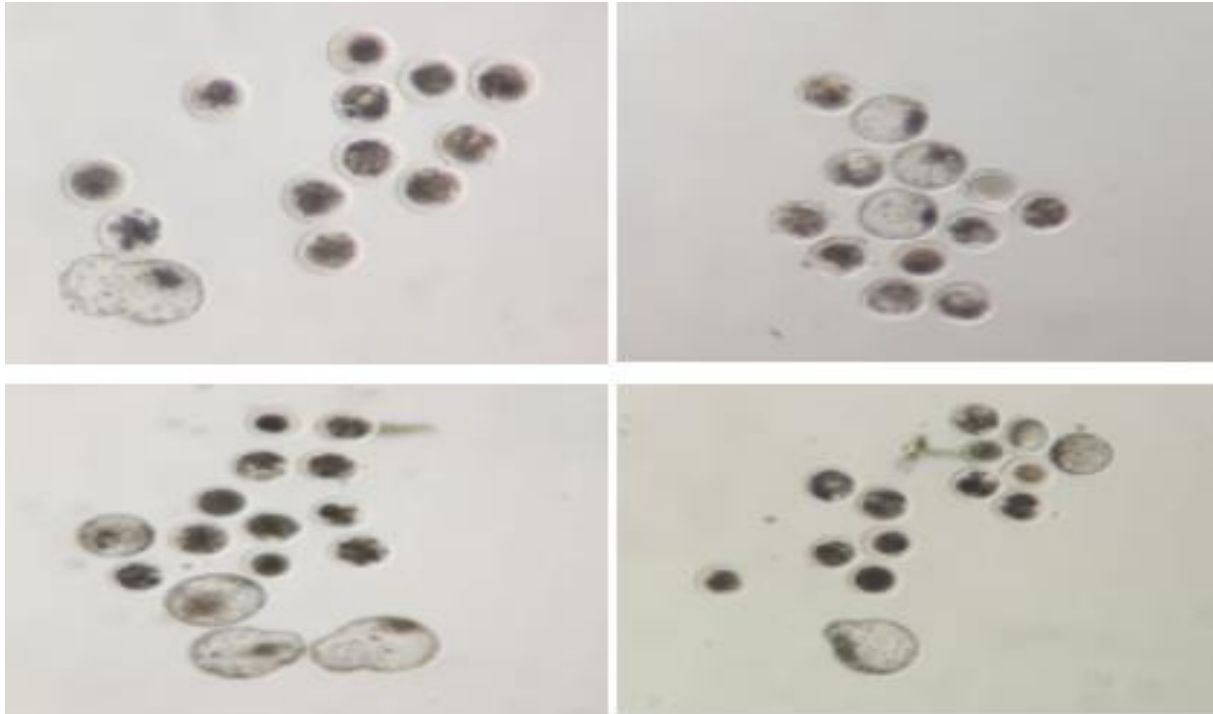


Figura 6. Blastocistos en diferentes estadios de desarrollo

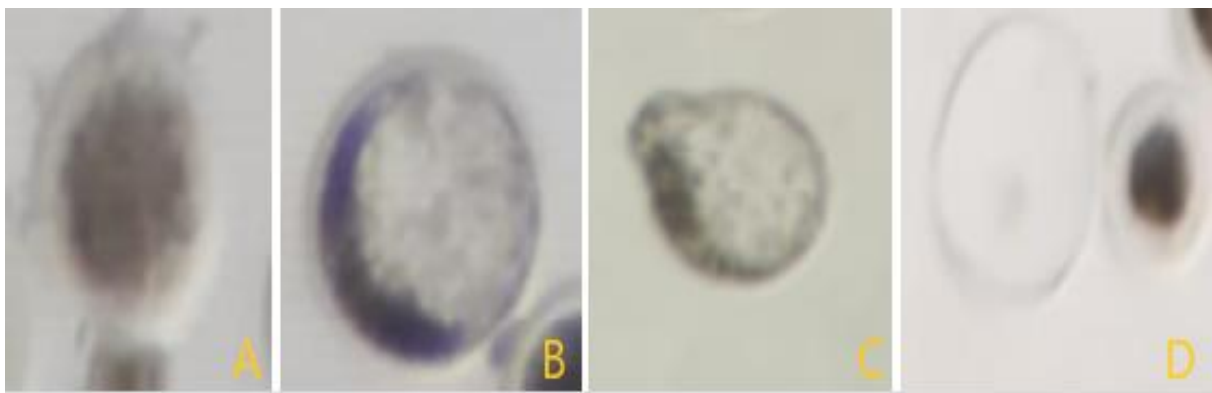


Figura 7. Estadios embrionarios: A) Blastocisto compacto; B) Blastocisto expandido; C) Blastocisto eclosionando; D) Blastocisto eclosionado.

3.3 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados en el software STATISTICA v.12. Los datos no paramétricos con las categorías dicotómicas fueron transformadas a datos paramétricos, atribuyendo a 100% a los maduros / clivados / blastocistos y 0% a los inmaduros / no clivados / no fertilizados. Un ANOVA de una vía y la prueba posHoc de Fisher (LSD) fueron usados para evaluar el efecto de los 4 tratamientos sobre la maduración (basado en MII) y desarrollo embrionario (basado en la tasa de clivaje y blastocistos). Finalmente, las categorías de

blastocistos tales como los compactos, expandidos, eclosionando y eclosionados fueron comparados en los 4 tratamientos usando una prueba no paramétrica de Kruscall Wallis. El nivel de significancia fue considerado $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Maduración ovocitaria

El porcentaje de ovocitos que fueron sometidos a maduración *in vitro* en cada tratamiento se muestra en la Figura 8.

El análisis comparativo del porcentaje de ovocitos maduros (en Metafase II) sometidos a maduración *in vitro* usando diferentes aditivos, osciló entre 78,5 y 88,9 % sin evidenciar diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$) (Figura 8).

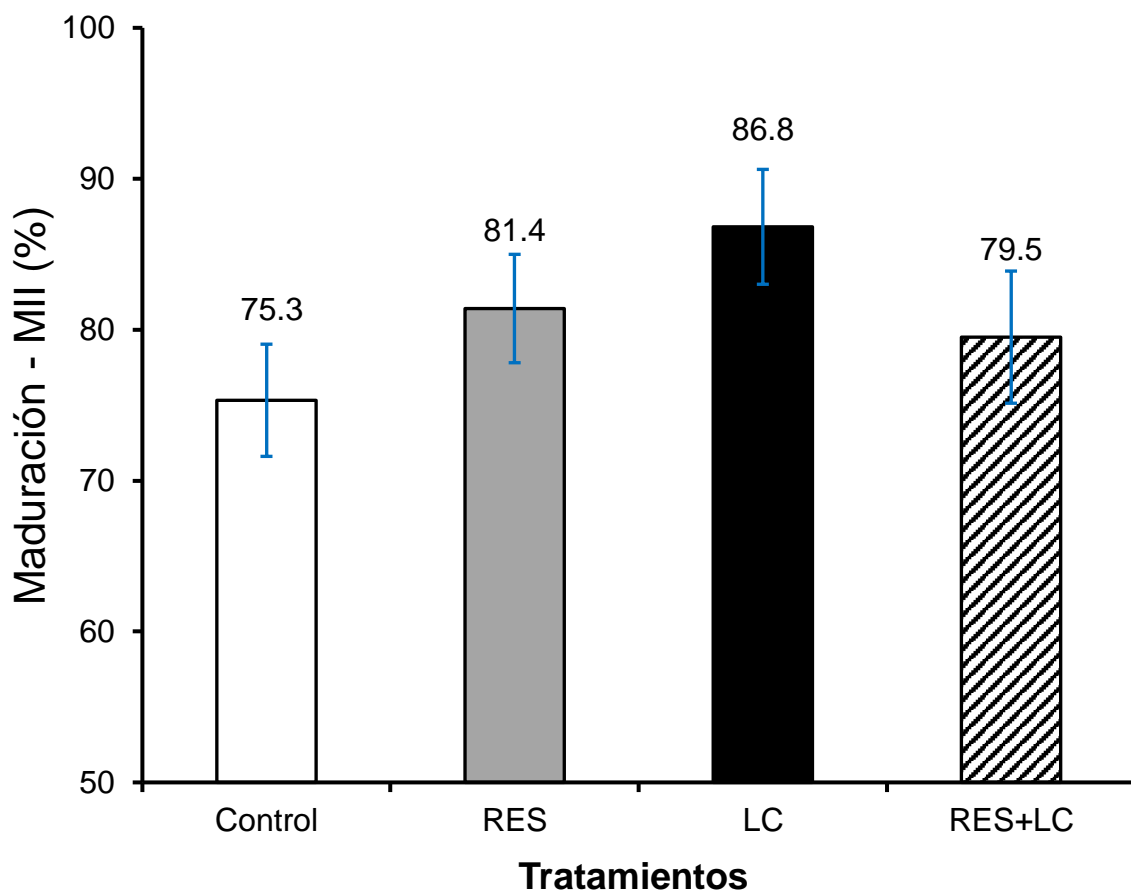


Figura 8. Porcentaje de ovocitos que alcanzaron la fase meiótica MII después de suplementar el medio MIV con Resveratrol (RES, $n = 147$), L-carnitina (LC, $n = 145$), y la mezcla de RES+LC ($n = 131$). El Control no tuvo aditivos ($n = 138$)

4.2. Producción *in vitro* de embriones bovinos

El efecto de los diferentes aditivos suplementados al medio de MIV sobre el porcentaje de división celular (clivaje) y desarrollo embrionario (blastocistos) se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente.

El grupo de ovocitos madurados *in vitro* con L-*carnitina* produjo un mayor porcentaje de división celular embrionaria (clivaje) que el grupo de ovocitos madurados *in vitro* sin suplementación (control) ($P < 0,05$). Los grupos de ovocitos sometidos a MIV con los medios suplementados con RES y RES+LC, sin embargo, no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de clivaje en comparación con el grupo LC y control (Figura 9).

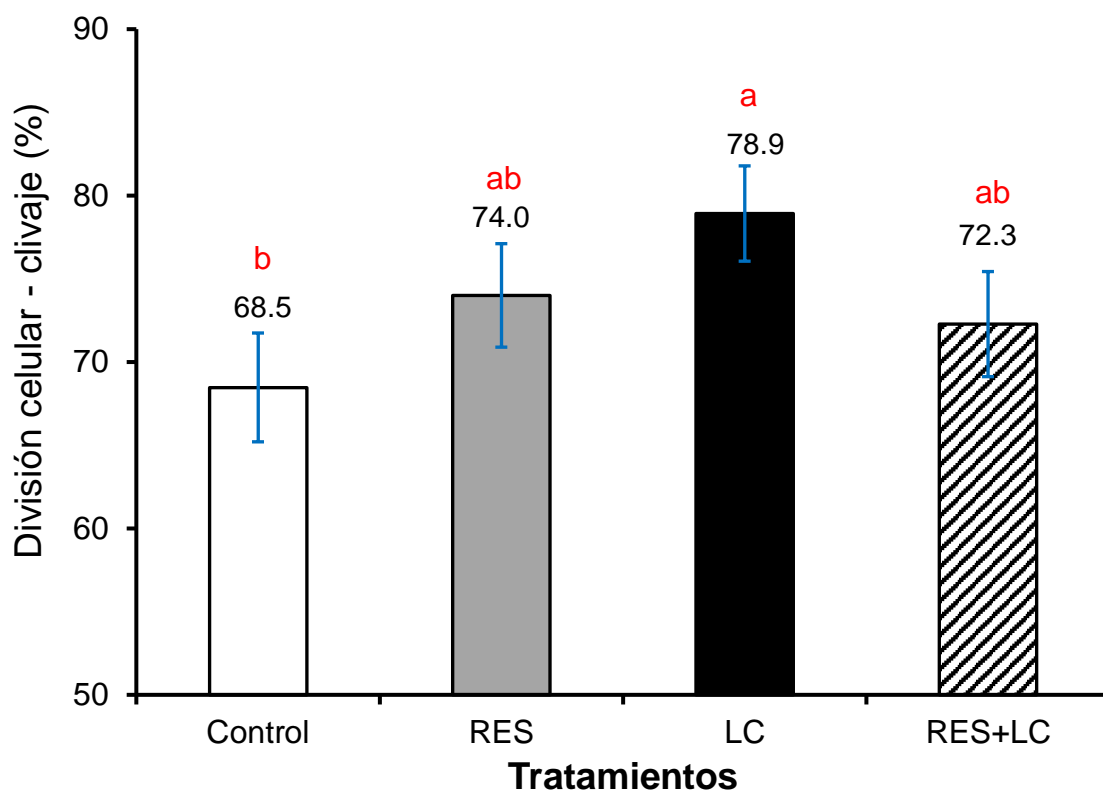


Figura 9. Tasa de clivaje a las 72 horas posterior a la fecundación *in vitro* de embriones bovinos provenientes de ovocitos madurados *in vitro* con diferentes aditivos: Control (n = 203) Resveratrol (RES, n = 200), L-*carnitina* (LC, n = 204), y RES+LC (n = 202). Letras diferentes en cada columna expresan diferencias significativas entre tratamientos a – b, $P < 0,05$

Después de 8 días de la fecundación *in vitro*, aquellos ovocitos sometidos a maduración con LC produjeron un porcentaje más alto de blastocistos que aquellos grupos de ovocitos madurados con RES+LC o sin aditivos (control) ($P < 0,05$) (Figura 10).

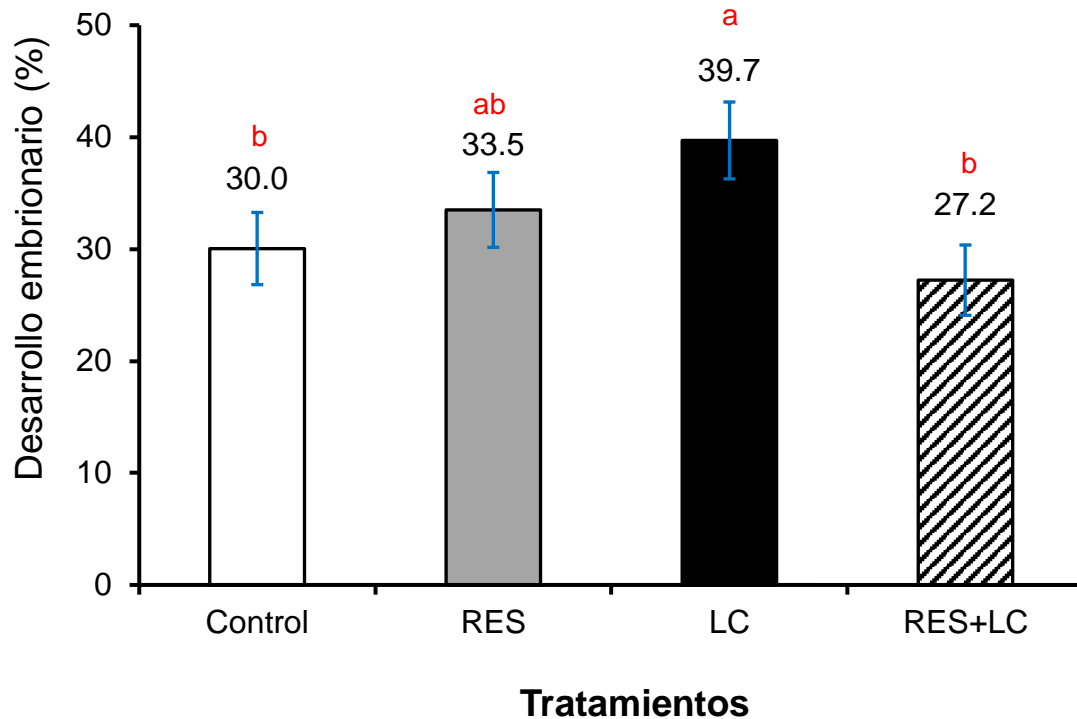


Figura 10. Tasa de desarrollo embrionario (blastocistos) a los 8 días posteriores a la fecundación *in vitro* de embriones bovinos provenientes de ovocitos madurados *in vitro* con diferentes aditivos: Control (n = 203) Resveratrol (RES, n = 200), L-carnitina (LC, n = 204), y RES+LC (n = 202). Letras diferentes en cada columna expresan diferencias significativas entre tratamientos a – b, $P < 0,05$.

Ocho días posteriores a la FIV, un total de 263 blastocistos fueron producidos en toda la investigación. De este número total, el porcentaje de blastocistos compactos fue mayor en el grupo de ovocitos madurados *in vitro* con LC en comparación con aquellos ovocitos madurados sin aditivos (control) y con RES+LC ($P < 0,05$). Por otro lado, el porcentaje de blastocistos expandidos fue significativamente mayor en todos los grupos suplementados con aditivos (RES, LC y RES+LC) durante la maduración *in vitro* en comparación con el grupo de ovocitos control ($P < 0,05$). Finalmente, no se evidenció diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos de aditivos del medio MIV en los porcentajes de blastocistos eclosionando y eclosionados (Tabla 5).

Tabla 5. Producción *in vitro* de blastocistos bovinos provenientes de ovocitos madurados *in vitro* con diferentes aditivos: Control, Resveratrol (RES), L-carnitina (LC), y RES+LC. Total de réplicas: 8 sesiones.

Estadio embrionario Blastocistos	Tratamientos					
		Control	RES	LC	RES+LC	Total
Compactos	(n)	15	21	26	12	74
	%	20,27 ^b	28,38 ^{ab}	35,14 ^a	21,82 ^b	28,14
Expandidos	(n)	36	36	45	32	149
	%	24,16 ^b	53,73 ^a	55,56 ^a	58,18 ^a	56,65
Eclosionando	(n)	3	4	4	2	13
	%	23,08	30,77	30,77	15,38	4,94
Eclosionados	(n)	6	6	6	9	27
	%	22,22	22,22	22,22	33,33	10,27
Total	(n)	60	67	81	55	263
	%	22,81	25,48	30,8	20,91	100%

Diferentes superíndices en la misma fila expresan diferencias significativas entre tratamientos, ^{a-b}, P < 0,05.

5. Discusión

La maduración *in vitro* permite obtener ovocitos maduros citoplasmática y nuclearmente para garantizar las siguientes fases tales como la fecundación y desarrollo temprano de embriones (Sovernigo et al., 2017). Los resultados obtenidos en la investigación indican que la suplementación con RES, LC y su combinación (RES+LC) al medio MIV produjo porcentajes deseables y útiles para la posterior FIV, sin embargo, su inclusión no solo produjo un mejoramiento de la tasa de ovocitos en metafase II. Por otro lado, la suplementación con LC al medio MIV produjo un incremento de la tasa de clivaje y desarrollo embrionario mostrando efectos significativos frente al control, RES y la combinación. Finalmente, a pesar de la adición de LC al medio MIV produjo una mayor tasa de blastocistos compactos, la suplementación de los ambos aditivos y RES, LC y su combinación RES+LC obtuvo mayores porcentajes de blastocistos expandidos frente al control. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la adición con LC al medio a pesar de que no se expresa significativamente en la maduración *in vitro* tiene un efecto benéfico en las tasas de desarrollo embrionario.

Investigaciones recientes realizadas por Bhakty et al. (2021) y Rahmatullah et al. (2023) demostraron que la suplementación con 3mg/ml de LC al medio MIV aumentó la tasa de maduración nuclear (MII) de los ovocitos bovinos y ovinos basado en el desarrollo de corpúsculos polares. El proceso de desarrollo de los óvulos y embriones de mamíferos está estrechamente ligado a su actividad metabólica. Junto con los carbohidratos, los lípidos desempeñan un papel fundamental como fuente de energía durante la maduración de los óvulos y el desarrollo embrionario (Dunning et al., 2010, 2011). La *L-carnitina* facilita la producción de ATP a partir de los lípidos que son procesados por las mitocondrias mediante la β oxidación. Los ácidos grasos son indispensables para la maduración y fertilización de los óvulos, así como para el desarrollo embrionario. Además de su función metabólica, la *L-carnitina* contribuye a reducir los niveles de ROS tanto en los óvulos como en los embriones (Wu et al., 2011). Se ha observado que los óvulos MII madurados en presencia de *L-carnitina* presentan niveles significativamente más bajos de H_2O_2 intracelular en comparación con los controles (Somfai et al., 2011). Por otro lado se ha sugerido que la *L-carnitina* como antioxidante protege de daños al ADN y la membrana mitocondrial inducidos por las ROS y además inhibe la apoptosis celular (Sovernigo et al., 2017). Knitlova et al. (2017) determinaron una influencia positiva de la *L-carnitina* en la maduración y desarrollo de ovocitos y embriones bovinos resaltando que su efecto depende específicamente de la competencia meiótica y del desarrollo de los ovocitos. Los resultados del presente trabajo son consistentes con los resultados de los trabajos anteriores.

Durante la PIVE, la cantidad de ROS puede desequilibrar la disponibilidad de los antioxidantes al producirse del metabolismo celular, por ello los niveles ROS son fundamentales para el éxito de la FIV porque la calidad embrionaria puede verse afectada por los efectos nocivos del medio de cultivo empleado (Rafaela et al., 2021). El RES produce un ligero aumento de la tasa de supervivencia de ovocitos bovinos posterior a la MIV, lo que indica que se mejora la calidad de los ovocitos (F. Wang et al., 2014). Los investigadores Agarwal et al. (2018) y Fathi & El-Shahat, (2017) afirman que la *L-carnitina* es importante para el metabolismo de lípidos actuando como cofactor para transportar AG que serán sometidos a oxidación beta en las mitocondrias para la producción de energía. Para la fertilización y producción *in vitro* eficiente de embriones de mamíferos, es indispensable la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos (Knitlova et al., 2017). En nuestro estudio, los ovocitos madurados *in vitro* con LC produjeron un porcentaje mayor de división celular embrionaria (clivados) que los ovocitos del grupo control (sin suplementar) y los grupos suplementados con RES y RES+LC no evidencian diferencias significativas con el clivaje obtenido en los ovocitos de los grupos LC y control. El porcentaje del clivaje obtenido con el grupo LC, se relaciona con la capacidad que tiene este antioxidante para generar energía (ATP) (Agarwal et al., 2018), elimina las ROS y aumenta el nivel de GSH (Fathi & El-Shahat, 2017).

Portocarrero et al. (2021) determinó que la suplementación con RES en el medio SOF, no incrementa los porcentajes de blastocistos bovinos obtenidos, sin embargo, mejora la calidad de estos al usarse una dosis de 0,5 μM . Giaretta et al. (2013) reporta mejoras en procesos de vitrificación de ovocitos de porcinos a una dosis de 2 μM , no obstante esta concentración de RES no generó efectos positivos en el porcentaje y calidad embrionaria. Sin embargo, Wang et al. (2014) reportó que el RES suplementado a una concentración de 1 μM mejora significativamente las tasas de clivaje y producción de blastocistos, no obstante, al aumentarse esta concentración, los efectos beneficiosos que brinda este aditivo van desapareciendo, esto según (Iwata, 2021), se debe a que el uso simultáneo de RES reduce las concentraciones de GSH afectando la calidad embrionaria pues se produce un efecto tóxico y preoxidante.

La LC transporta ácidos grasos (AG) desde el citoplasma hacia las mitocondrias durante la descomposición lipídica para la producción de energía metabólica, neutraliza radicales libres en especial a los aniones superóxido y protege de apoptosis por daño oxidativo (Jiang et al., 2019), mostrando efectos beneficiosos en la PIVE. Los resultados obtenidos en cuanto a la producción embrionaria (blastocistos) fue superior en los ovocitos madurados *in vitro* con LC, en comparación a los grupos RES, RES+LC y control. El estudio presenta similitudes al realizado por Fathi & El-Shahat, (2017) que menciona que al suplementar *L-carnitina* a una

concentración de 0,5 mg/ml en medios de maduración o cultivo *in vitro* mejoran notoriamente la maduración nuclear de ovocitos y la producción de blastocistos, esto realizado en dromedarios.

En relación a los estadios de los blastocistos, los resultados obtenidos muestran que el grupo LC produjo un porcentaje mayor de blastocistos compactos que los grupos control, RES y RES+LC. La L-carnitina cumple varias funciones que aportan beneficios en el desarrollo de ovocitos y blastocistos tempranos (J. Li et al., 2021), junto con el propinil y Acetil-L-carnitina mejoran el rendimiento reproductivo (Dunning & Robker, 2012), además, protege las mitocondrias del estrés oxidativo (Mingorance et al., 2011). De este modo el uso de la LC mejora la calidad ovocitaria y genera mayor competencia en el desarrollo de embriones.

Los porcentajes de blastocistos obtenidos en los grupos RES, LC y RES+LC muestran que existe diferencia significativa al ser comparados con el grupo control, esto nos indica que los efectos antioxidantes de los aditivos empleados en los medios lograron expresarse sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. Finalmente, no existe significancia entre los porcentajes de blastocistos en eclosión y eclosionados en los cuatro grupos evaluados. Estos resultados presentan similitud con lo expuesto por Held-Hoelker et al. (2017) que muestra que los embriones cultivados con presencia de LC, muestran tasas de expansión significativamente más altas.

La investigación de Lowe et al. (2017), presenta similares resultados que muestran que la adición de L-carnitina en un medio de cultivo *in vitro* para embriones en porcinos, aumenta la tasa de escisión y mejora la producción y calidad de blastocistos en el día 7. Takahashi et al. (2013) concluye que la LC como suplemento en dosis de 1.518 a 3.03 μM en medios de CIV de embriones bovinos ejerce efectos como activador metabólico y eliminador de ROS generando un mejor desarrollo embrionario y aumentando el número de células de los blastocistos resultantes. Esto nos ofrece una forma no invasiva y segura de mejorar la PIVE en bovinos.

6. Conclusiones

Esta investigación concluye que la suplementación con RES, LC y su combinación (RES+LC) al medio MIV no mejoró la tasa de maduración de ovocitos en metafase II. La suplementación con LC al medio MIV, a pesar de que no se expresó su efecto en la maduración ovocitaria, incrementó de la tasa de clivaje y desarrollo embrionario (blastocistos compactos y expandidos). Finalmente, el Resveratro y su combinación L-carnitina no tuvo efecto significativo en el desarrollo embrionario.

7. Recomendaciones

- Realizar más réplicas de este estudio investigativo con el uso de estos aditivos - antioxidantes sobre la PIVE en bovinos, debido a que los resultados obtenidos son promisorios.
- Realizar un mayor número de maniobras realizadas en la presente investigación sobre la PIVE con el objetivo de aumentar el valor de n ya que se han obtenido resultados de producción y desarrollo embrionario bastante deseables.

Referencias

- Abdelrazik, H., Sharma, R., Mahfouz, R., & Agarwal, A. (2009). L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertility and Sterility*, *91*(2), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.067>
- Agarwal, A., Durairajanayagam, D., & du Plessis, S. S. (2014). Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: An evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *12*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-112>
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2005). Oxidative stress and its implications in female infertility - A clinician's perspective. *Reproductive BioMedicine Online*, *11*(5), 641–650. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61174-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61174-1)
- Agarwal, A., Sengupta, P., & Durairajanayagam, D. (2018). Role of L-carnitine in female infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *16*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0323-4>
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014). Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, *32*(1), 1. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Aguirre, C. A., Palacios, F. M., Hernández, P. P., & Sánchez, J. G. (2009). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*, *27*(3), 277–284.
- Aliabadi, E., Mehranjani, M. S., Borzoei, Z., Talaei-Khozani, T., Mirkhani, H., & Tabesh, H. (2012). Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, *10*(2), 77–82.
- Alikani, M., Sadowy, S., & Cohen, J. (2002). Human Embryo Morphology and Developmental Capacity. *Assessment of Mammalian Embryo Quality*, 1–31. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0343-8_1
- Almeida, T., Drummond, E., Saraiva, N. Z., Perecin, F., Niciura, S. C. M., Ferreira, C. R., Oliveira, C. S., & Garcia, J. M. (2011). The effects of ovalbumin as a protein source during the in vitro production of bovine embryos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *40*(10), 2135–2141. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011001000010>
- Báez, F., Pirela, A., Landinez, J., & Villamediana, P. (2009). Efecto De La Vitrificación Sobre La Viabilidad De Ovocitos Bovinos Madurados in Vitro. *BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS*, *43*(2), 197–210.
- Balasubramanian, S., Son, W. J., Kumar, B. M., Ock, S. A., Yoo, J. G., Im, G. S., Choe, S. Y., & Rho, G. J. (2007). Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, *68*(2), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.044>

- Bhakty, Z. W., Kaiin, E. M., Karja, N. W. K., & Setiadi, M. A. (2021). L-carnitine Supplementation Enhances Nuclear and Cytoplasmic Maturation Rates of Sheep Oocytes In Vitro. *Tropical Animal Science Journal*, *44*(2), 131–137. <https://doi.org/10.5398/TASJ.2021.44.2.131>
- Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, *55*(3), 282–288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7)
- Block, J., Hansen, P. J., Loureiro, B., & Bonilla, L. (2011). Improving post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, *76*(9), 1602–1609. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.025>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2018). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*, *10*(3), 344–348.
- Boni, R., Cuomo, A., & Tosti, E. (2002). Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*, *66*(3), 836–842. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.3.836>
- Chang, H. C., & Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *25*(3), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.001>
- Chung, I. M., Park, M. R., Chun, J. C., & Yun, S. J. (2003). Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, *164*(1), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00341-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00341-2)
- Combelles, C. M. H., Gupta, S., & Agarwal, A. (2009). Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reproductive BioMedicine Online*, *18*(6), 864–880. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60038-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60038-7)
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., & Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, *320*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>
- Dunning, K. R., Akison, L. K., Russell, D. L., Norman, R. J., & Robker, R. L. (2011). Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to L-Carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice. *Biology of Reproduction*, *85*(3), 548–555. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090415>

- Dunning, K. R., Cashman, K., Russell, D. L., Thompson, J. G., Norman, R. J., & Robker, R. L. (2010). Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biology of Reproduction*, *83*(6), 909–918. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084145>
- Dunning, K. R., & Robker, R. L. (2012). Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality. *Animal Reproduction Science*, *134*(1–2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.013>
- Fathi, M., & El-Shahat, K. H. (2017). L-carnitine enhances oocyte maturation and improves in vitro development of embryos in dromedary camels (*Camelus dromedaries*). *Theriogenology*, *104*, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.006>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2019). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal Feed Science and Technology*, 1–14. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Filipiak, Y., & Larocca, C. (2014). Manual de Fertilización in vitro en bovinos. *Departamento de Reproducción Animal*.
- Gallego, F., Mancheno, A., Mena, L., & Murillo, A. (2022). Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.*, *2*(1), 172–185. <https://doi.org/10.18502/espoch.v2i2.11192>
- Gambini, J., López-Grueso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., Bonet-Costa, V., Borrás, C., & Viña, J. (2013). Resveratrol: Distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia*, *48*(2), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2012.04.007>
- Gangwar, D. K., & Atreja, S. K. (2015). Signalling Events and Associated Pathways Related to the Mammalian Sperm Capacitation. *Reproduction in Domestic Animals*, *50*(5), 705–711. <https://doi.org/10.1111/rda.12541>
- García, J., Restrepo, S., Sánchez, N., Moreno, E., Dubeibe, D., & Mogollón, E. (2017). Manual De Procedimientos Para La Reproduccion Y Vitrificacion De Embriones Bovinos En Laboratorio De Reproduccion Animal. *SENA: Servicio Nacional de Aprendizaje*, 17–23.
- Giarretta, E., Spinaci, M., Bucci, D., Tamanini, C., & Galeati, G. (2013). Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/920257>
- Gottardi, F. P., & Mingoti, G. Z. (2010). Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 82–94.

- Guérin, P., El Mouatassim, S., & Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2), 175–189. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>
- Gupta, S., Malhotra, N., Sharma, D., Chandra, A., & Ashok, A. (2009). Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: Clinical implications. *International Journal of Fertility and Sterility*, 2(4), 147–164.
- Hara, T., Kin, A., Aoki, S., Nakamura, S., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2018). Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrifiedwarmed bovine embryos. *PLoS ONE*, 13(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204571>
- Hatyrnaz, Ş., Ata, B., Tan, J., Tan, S. L., Hatyrnaz, E. S., Dahan, M. H., & Tannus, S. (2018). Oocyte in vitro maturation : A sytematic review Oosit in vitro matürasyonu : Bir sistematik derleme. *National Center for Biotechnology Information*. <https://doi.org/10.4274/tjod.23911>
- Held-Hoelker, E., Klein, S. L., Rings, F., Salilew-Wondim, D., Zidane, M., Neuhoff, C., Tesfaye, D., Schellander, K., & Hoelker, M. (2017). Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*, 96, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.014>
- Henkel, R. R. (2011). Leukocytes and oxidative stress: Dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), 43–52. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.76>
- Hernández, D., Wood, C., Castro, S., & Covarrubias, L. (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2), 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.020>
- Hwang, I. S., & Hochi, S. (2014). Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/570647>
- Iwata, H. (2021). Resveratrol enhanced mitochondrial recovery from cryopreservation-induced damages in oocytes and embryos. *Reproductive Medicine and Biology*, 20(4), 419–426. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12401>
- Jaramillo, B., Arzuaga, N., Giraldo, J., & Vásquez, J. N. A. (2019). Parámetros metabólicos, antioxidantes y competencia para el desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados in vitro con L-Carnitina. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(1), 265–275. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15703>
- Jiang, W. J., Yao, X. R., Zhao, Y. H., Gao, Q. S., Jin, Q. G., Li, Y. H., Yan, C. G., & Xu, Y. N. (2019). L-Carnitine prevents bovine oocyte aging and promotes subsequent embryonic development. *Journal of Reproduction and Development*, 65(6), 499–506.

- <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-046>
- Jin, S. K., & Yang, W. X. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: How are they regulated? *Oncotarget*, 8(2), 3600–3627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12274>
- Karagenc, L., Sertkaya, Z., Ciray, N., Ulug, U., & Bahçeci, M. (2004). Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(4), 409–417. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61276-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61276-X)
- Knitlova, D., Hulinska, P., Jeseta, M., Hanzalova, K., Kempisty, B., & Machatkova, M. (2017). Supplementation of L-carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology*, 102, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.025>
- Krisher, R. L., Brad, A. M., Herrick, J. R., Sparman, M. L., & Swain, J. E. (2007). A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Animal Reproduction Science*, 98(1–2), 72–96. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.006>
- Kulkarni, S. S., & Cantó, C. (2015). The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), 1114–1123. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.005>
- Lampiao, F. (2012). Free radicals generation in an in vitro fertilization setting and how to minimize them . *World Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1(3), 29. <https://doi.org/10.5317/wjog.v1.i3.29>
- Landínez, J., Villamediana, P., Hernández, H., & Soto, E. (2010). Efecto del tiempo de maduración in vitro de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. *Theriogenology*, 20(6), 659–664. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95916206013.pdf>
- Li, J., Liu, L., Weng, J., Yin, T., Yang, J., & Feng, H. L. (2021). Biological roles of l-carnitine in oocyte and early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 88(10), 673–685. <https://doi.org/10.1002/mrd.23542>
- Li, R., Liu, Y., Pedersen, H. S., & Callesen, H. (2014). Effect of ambient light exposure of media and embryos on development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos. *Zygote*, 23(3), 378–383. <https://doi.org/10.1017/S096719941300066X>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2008). In vitro-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology*, 69(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>
- Lowe, J. L., Bartolac, L. K., Bathgate, R., & Grupen, C. G. (2017). Supplementation of culture medium with L-carnitine improves the development and cryotolerance of in vitro-produced porcine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(12), 2357–2366. <https://doi.org/10.1071/RD16442>
- Mayes, M. A., & Sirard, M. A. (2002). Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors

- on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. *Biology of Reproduction*, 66(1), 180–184. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.180>
- Mingorance, C., Rodriguez, R., Justo, M. L., Herrera, M. D., & de Sotomayor, M. A. (2011). Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L-carnitine. *Nutrition Reviews*, 69(5), 279–290. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00387.x>
- Mishra, A., Reddy, I. J., Gupta, P. S. P., & Mondal, S. (2016). L-carnitine Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Transcript Level of Antioxidant Enzymes in Sheep Embryos Produced In Vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(2), 311–321. <https://doi.org/10.1111/rda.12682>
- Morado, S. A., Cetica, P. D., Beconi, M. T., & Dalvit, G. C. (2009). Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(4), 608–614. <https://doi.org/10.1071/RD08198>
- Ortega, A. M., Izquierdo, A. C., Gómez, J. J. H., Olivares-Corichi, I. M., Torres, V. M. M., & De Jesus Valencia Mendez, J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, 28(12).
- Palma, G. (2011). Produccion in Vitro De Embriones Bovinos. *Biotechnología de La Reproducción, December*, 1–13.
- Palma, G. (2018). Producción in vitro de embriones bovinos. *National Scientific and Technical Research Council, December*.
- Park, S. J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., Ke, H., Rehmann, H., Taussig, R., Brown, A. L., Kim, M. K., Beaven, M. A., Burgin, A. B., Manganiello, V., & Chung, J. H. (2012). Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*, 148(3), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.017>
- Patrizio, P., Fragouli, E., Bianchi, V., Borini, A., & Wells, D. (2007). Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(3), 346–353. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60349-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60349-5)
- Pocar, P., Augustin, R., & Fischer, B. (2004). Constitutive expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes in Vitro: Mechanisms and biological implications. *Endocrinology*, 145(4), 1594–1601. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1254>
- Portocarrero, G. T., Cortez, J. V., Murga, N. L., Beloti, K., & Encina, R. (2021). Efecto del resveratrol en el porcentaje y calidad de embriones in vitro generados por separación de blastómeras en bovinos. *Revista Veterinaria*, 32(1), 101. <https://doi.org/10.30972/vet.3215644>
- Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J. Y., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B. J.,

- Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J. S., Hubbard, B. P., Varela, A. T., Davis, J. G., Varamini, B., Hafner, A., Moaddel, R., Rolo, A. P., Coppari, R., Palmeira, C. M., ... Sinclair, D. A. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism*, 15(5), 675–690. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.003>
- Quintanilla, L., Huanca, W., Córdova, A., Ampuero, A., & Benavides, L. (2015). Efecto de la Suplementación del Medio de Maduración con Cisteamina y de Dos Medios de Cultivo (KSOMaa y SOF) en la Fecundación in vitro de Ovocitos Bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(3), 462. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11178>
- Rafaela, A., Silva, N., Caroline, E., Santos, S., Macedo, I. M., Teixeira, R. C., & Martins, C. F. (2021). Resveratrol-supplemented holding or re-culture media improves viability of fresh or vitrified-warmed in vitro -derived bovine embryos A suplementação dos meios de manutenção ou re-cultivo com resveratrol melhora a viabilidade de embriões bovinos produzidos in vitro La suplementación de los medios de mantenimiento o de recultivo com resveratrol mejora La. 2021, 1–13.
- Rahmatullah, R., Setiadi, M. A., & Supriatna, I. (2023). Heparin and Hypotaurine Supplementation Improve the Fertilization Rate of Sheep Oocytes Matured in Media Containing L-Carnitine in Vitro. *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 121–126. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v16i4.27339>
- Restrepo, G., Varela, E., Duque, J. E., Gómez, J. E., & Rojas, M. (2019). Freezing, Vitrification, and Freeze-Drying of Equine Spermatozoa: Impact on Mitochondrial Membrane Potential, Lipid Peroxidation, and DNA Integrity. *Journal of Equine Veterinary Science*, 72, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.006>
- Salgado, E., & Lopera, R. (2020). Essential aspects on in vitro fertilization techniques in cattle. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(3), 1–14. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I3.17138>
- Sansiñena, M., & Gasparini, B. (2016). Producción in vitro de embriones en el búfalo. *Biblioteca Digital de La Universidad Católica de Argentina, January 2010*, 120–139.
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., & Dekel, N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1462–1467. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017213108>
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126–136.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>

Smith, G. D., Ph, D., Monteiro, A., & Ph, D. (2012). Advances in Embryo Culture Systems. *Semin Reprod Med*, 214–221.

Soliman, G. A. (2013). The role of mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes signaling in the immune responses. *Nutrients*, 5(6), 2231–2257. <https://doi.org/10.3390/nu5062231>

Somfai, T., Kaneda, M., Akagi, S., Watanabe, S., Haraguchi, S., Mizutani, E., Dang-Nguyen, T. Q., Geshi, M., Kikuchi, K., & Nagai, T. (2011). Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(7), 912–920. <https://doi.org/10.1071/RD10339>

Sovernigo, T. C., Adona, P. R., Monzani, P. S., Guemra, S., Barros, F. D. A., Lopes, F. G., & Leal, C. L. V. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 561–569. <https://doi.org/10.1111/rda.12946>

Stites, T. E., Mitchell, A. E., & Rucker, R. B. (2000). Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors. *Journal of Nutrition*, 130(4), 719–727. <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.719>

Stroebech, L., Mazzoni, G., Pedersen, H. S., Freude, K. K., Kadarmideen, H. N., Callesen, H., & Hyttel, P. (2015). In vitro production of bovine embryos : revisiting oocyte development and application of systems biology In vitro production of bovine embryos : revisiting oocyte development and application of systems biology. *Animal Reproduction*, September.

Sudano, M. J., Paschoal, D. M., da Silva Rascado, T., Magalhães, L. C. O., Crocomo, L. F., de Lima-Neto, J. F., & da Cruz Landim-Alvarenga, F. (2011). Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, 75(7), 1211–1220. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>

Takahashi, T., Inaba, Y., Somfai, T., Kaneda, M., Geshi, M., Nagai, T., & Manabe, N. (2013). Supplementation of culture medium with class L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(4), 589–599. <https://doi.org/10.1071/RD11262>

Takenaka, M., Horiuchi, T., & Yanagimachi, R. (2007). Effects of light on development of mammalian zygotes. *National Academy of Sciences*, 25(4), 301–302. <https://doi.org/10.3109/07853899309147287>

Thomas, R. E., Thompson, J. G., Armstrong, D. T., & Gilchrist, R. B. (2004). Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on

- meiotic and developmental capacity. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1142–1149. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024828>
- Torres, V., & Urrego, R. (2019). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. *Rev Mex Cienc Pecu*, 10(2), 433–459.
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., Tan, D., & Liu, G. (2014). Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 101(2). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.041>
- Wang, Y., Zhang, M., Chen, Z. J., & Du, Y. (2018). Resveratrol promotes the embryonic development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 54(6), 430–438. <https://doi.org/10.1007/s11626-018-0262-6>
- Wei, Y., Idrees, M., Sidrat, T., Joo, M., Xu, L., Ko, J., & Kong, I. (2022). BOEC–Exo Addition Promotes In Vitro Maturation of Bovine Oocyte and Enhances the Developmental Competence of Early Embryos. *Animals*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/ani12040424>
- Will, M. A., Clark, N. A., & Swain, J. E. (2011). Biological pH buffers in IVF: Help or hindrance to success. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(8), 711–724. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9582-0>
- Wu, G. Q., Jia, B. Y., Li, J. J., Fu, X. W., Zhou, G. B., Hou, Y. P., & Zhu, S. E. (2011). L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology*, 76(5), 785–793. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.011>
- Xu, H., Jia, C., Cheng, W., Zhang, T., Tao, R., Ma, Y., Si, L., Xu, Y., & Li, J. (2020). The Effect of L-Carnitine Additive during in Vitro Maturation on the Vitrification of Pig Oocytes. *Cellular Reprogramming*, 22(4), 198–207. <https://doi.org/10.1089/cell.2020.0014>
- Zhou, X., Liu, F., & Zhai, S. (2007). Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: A systematic review. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(SUPPL.1), 383–390.
- Zullo, G., Albero, G., Neglia, G., De Canditiis, C., Bifulco, G., Campanile, G., & Gasparri, B. (2016). L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology*, 85(4), 688–697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.008>

Anexos



Anexo A. Preparación de Medios para PIVE



Anexo B. Preparación de materiales para recuperación de COC's



Anexo C. Recolección de ovarios del camal municipal de Cuenca



Anexo D. Transporte de ovarios hacia el laboratorio

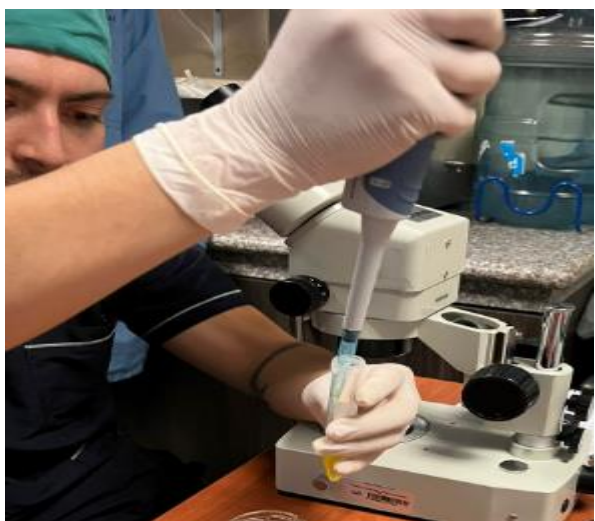




Anexo E. Limpieza de excedentes y lavado de ovarios

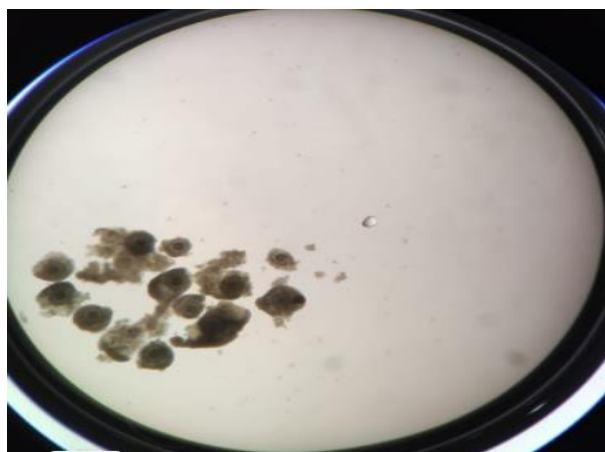
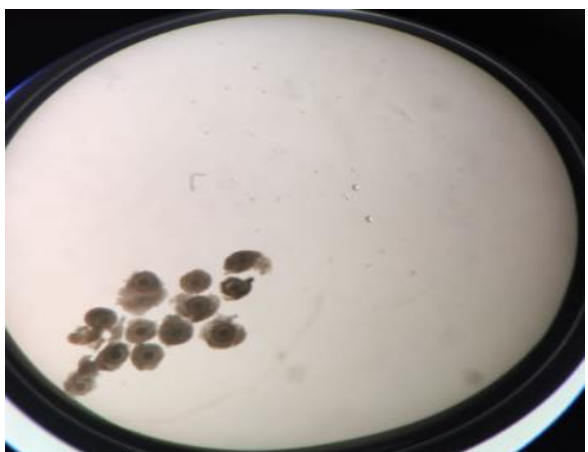
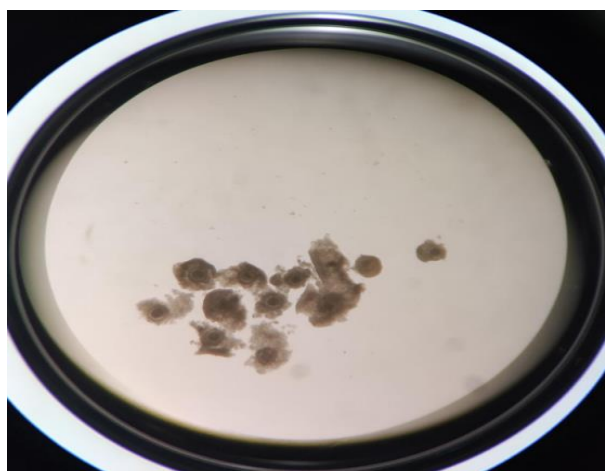


Anexo D. Aspiración folicular

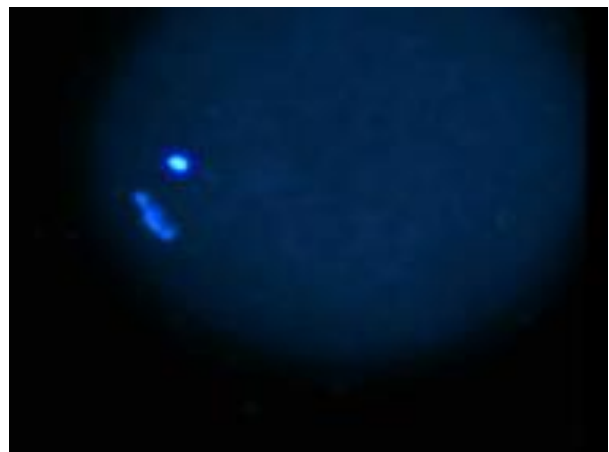
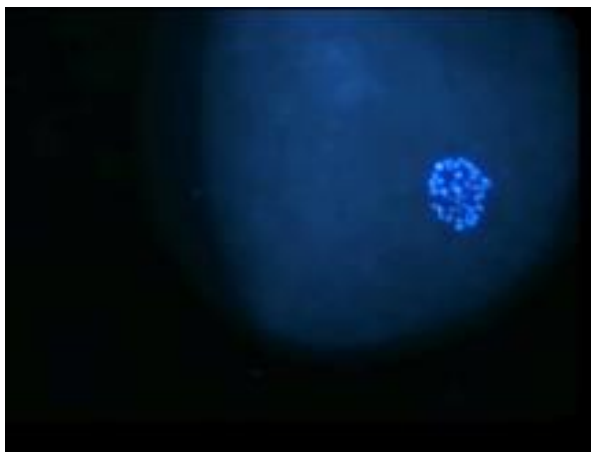
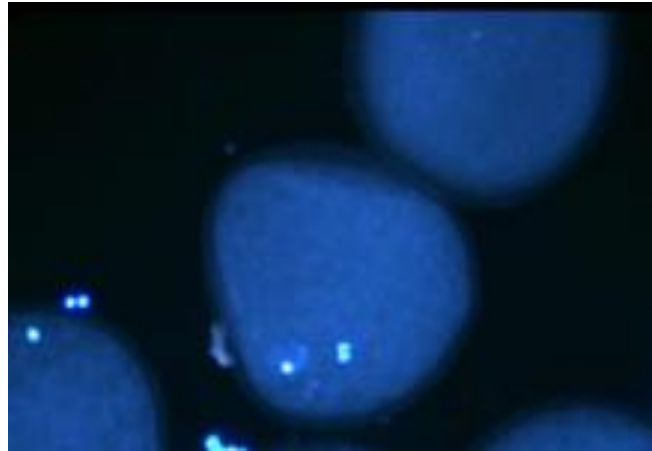




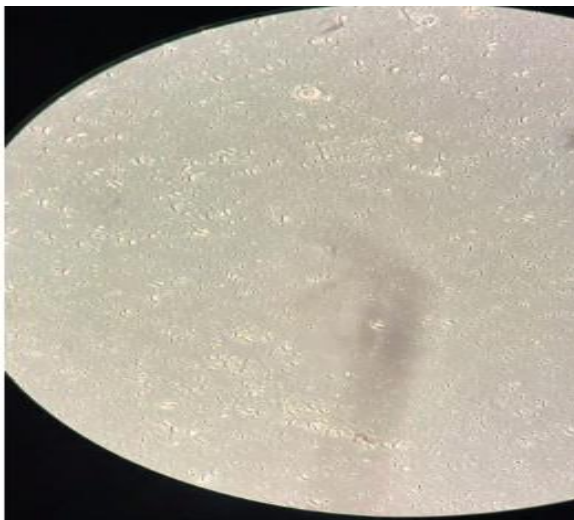
Anexo F. Recuperación y clasificación de ovocitos



Anexo G. Maduración *in vitro*



Anexo H. Tinción y evaluación de maduración nuclear de ovocitos



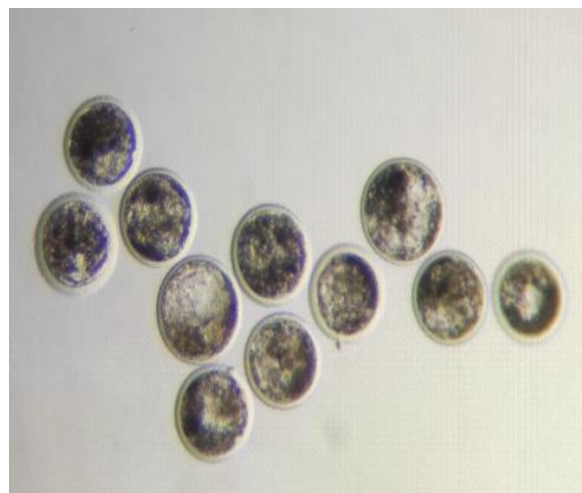
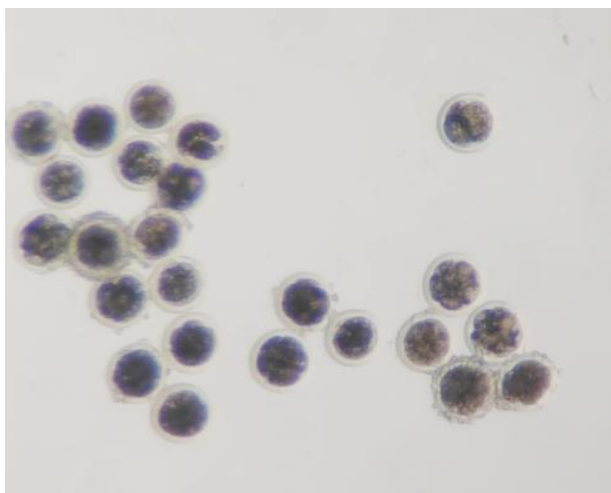
Anexo I. Fecundación *in vitro*

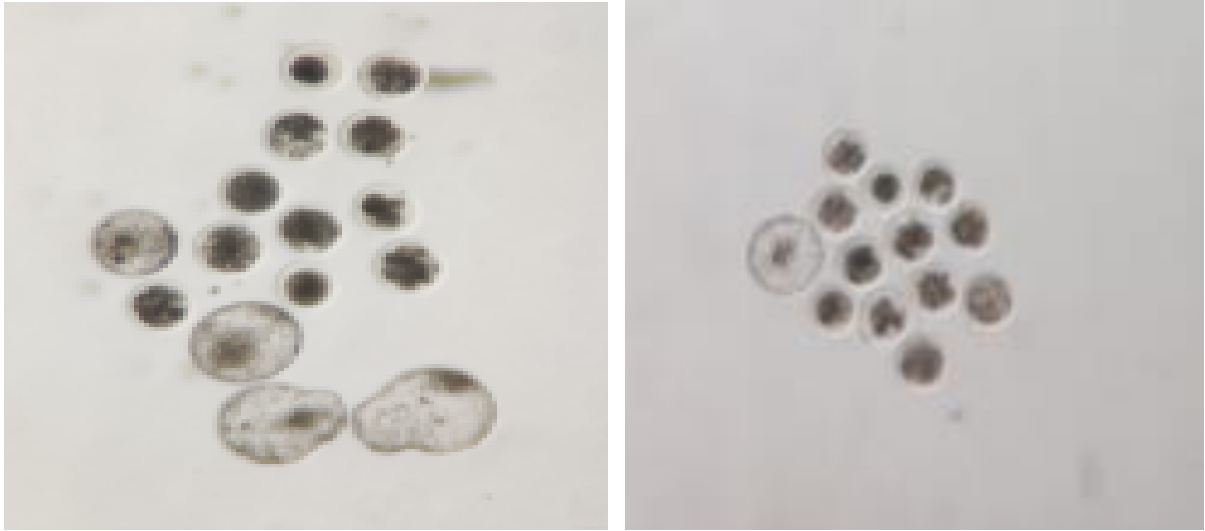


Anexo J. Cultivo *in vitro*



Anexo K. Evaluación de la tasa de Clivaje





Anexo L. Evaluación de desarrollo embrionario