

UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto del KnockOut™ Serum Replacement y del Suero Fetal Bovino en el cultivo y criotolerancia de embriones bovinos producidos in vitro

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

Autor:

Hernán Eduardo Aguirre Durán

CI: 0103619730

haguirred@outlook.com

Directora:

Dra. María Silvana Méndez Álvarez, M.Sc.

CI: 010260637-3

Cuenca, Ecuador
06 de octubre de 2022

RESUMEN

Se propuso como objetivo de esta investigación evaluar el efecto del KnockOut™ Serum Replacement como sustituto del suero fetal bovino en la producción y congelación de embriones bovinos producidos *in vitro*. Se recolectaron ovarios *postmortem* y se transportaron al laboratorio Singamia donde se obtuvieron los complejos ovocito-cúmulo (COCs). Los COCs (n=1798) fueron madurados y fecundados *in vitro* (FIV), y los presuntos embriones fueron incubados por 6 días en un medio de cultivo suplementado con 5% de KnockOut™ Serum Replacement (KSR; n=589), o 5% de Suero Fetal Bovino (SFB; n=555), o 0,6% de albúmina sérica bovina (BSA; n=654). En el día 7 luego de la FIV, los embriones fueron clasificados y los de calidad 1 fueron congelados y almacenados en nitrógeno líquido. Un grupo de embriones fue descongelado y sometido a una doble tinción fluorescente (yoduro de propidio y Hoechst) para determinar el número total de blastómeras, y el número de blastómeras intactas y con alteración de la membrana plasmática. Otro grupo de embriones fue descongelado e incubado por 72 horas para determinar la sobrevivencia embrionaria a las 4, 24, 48 y 72 horas post-descongelación. Los embriones cultivados con SFB ($P=0,0214$) y KSR ($P=0,0681$) produjeron mayor porcentaje de blastocistos y menor proporción de mórlulas y blastocistos tempranos que BSA ($P<0,05$). Del grupo SFB se produjo un porcentaje mayor de blastocistos regulares que KSR y BSA. Luego de la descongelación los embriones cultivados con KSR tuvieron menor número y proporción de células alteradas que los SFB y BSA ($P<0,05$). La tasa de reexpansión y eclosión a las 4, 24, 48 y 72 horas fue significativamente menor en los embriones cultivados con SFB y KSR que con BSA, siendo los de KSR los que lograron menor tasa de sobrevivencia. En conclusión, con la adición de KSR o SFB se obtuvo mayor proporción de blastocistos y menor proporción de embriones en estadios tardíos de desarrollo que BSA. Aunque se observó una menor proporción de células alteradas en KSR, este grupo y SFB experimentaron menor tasa de sobrevivencia pos-descongelación que BSA.

Palabras clave: Suero Fetal Bovino. KnockOut™ Serum Replacement. Cultivo *in vitro*. Producción de blastocistos. Crioresistencia.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of KnockOut™ Serum Replacement as a substitute for fetal bovine serum in the production and freezing of bovine embryos produced in vitro. Ovaries were collected postmortem and transported to the Singamia laboratory where oocyte-cumulus complexes (COCs) were obtained. The COCs (n=1798) were matured and fertilized in vitro (IVF), and the presumptive embryos were incubated for 6 days in culture medium supplemented with 5% KnockOut™ Serum Replacement (KSR; n=589), or 5% Fetal Bovine Serum (SFB; n=555), or 0.6% bovine serum albumin (BSA; n=654). On day 7 after IVF, embryos were sorted and quality 1 embryos were frozen and stored in liquid nitrogen. One group of embryos was thawed and subjected to fluorescent double staining (propidium iodide and Hoechst) to determine the total number of blastomeres, and the number of intact and plasma membrane disrupted blastomeres. Another group of embryos was thawed and incubated for 72 hours to determine embryo survival at 4, 24, 48 and 72 hours post-thawing. Embryos cultured with SFB ($P=0.0214$) and KSR ($P=0.0681$) produced a higher percentage of blastocysts and a lower proportion of morulae and early blastocysts than BSA ($P<0.05$). From the SFB group, a higher percentage of regular blastocysts was produced than KSR and BSA. After thawing, embryos cultured with KSR had a lower number and proportion of altered cells than SFB and BSA ($P<0.05$). The re-expansion and hatching rate at 4, 24, 24, 48 and 72 hours was significantly lower in embryos cultured with SFB and KSR than with BSA, with KSR embryos achieving the lowest survival rate. In conclusion, the addition of KSR or SFB resulted in a higher proportion of blastocysts and a lower proportion of late stage embryos than BSA. Although a lower proportion of altered cells was observed in KSR, this group and SFB experienced lower post-thaw survival rate than BSA.

Key words: Bovine Fetal Serum. KnockOut™ Serum Replacement. In vitro Culture. Blastocyst production. Cryoresistance.

ÍNDICE DEL TRABAJO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DEL TRABAJO	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE ANEXOS	7
CLAUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACION PARA PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	8
CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	9
AGRADECIMIENTOS	10
DEDICATORIA	11
CAPITULO I	12
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. General	15
2.2. Específicos	15
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	15
CAPITULO II	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1.1. Producción de embriones in vitro	16
2.1.2. Maduración in vitro	17
2.1.3. Fecundación in vitro	18
2.1.4. Cultivo in vitro	20
2.1.5. Criopreservación de embriones	25
2.1.6. Evaluación del desarrollo y calidad embrionaria	26
CAPITULO III	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Materiales	30
3.1.1. Físicos	30
3.1.2. Biológicos	30
3.1.3. De laboratorio	30
3.1.4. Químicos y biológicos	31
3.2. Metodología	32

3.2.1. Área de estudio.....	32
3.2.2. Elaboración y composición de los medios.....	33
3.2.3. Diseño experimental	35
3.2.4. Recolección de ovarios	35
3.2.5. Obtención de ovocitos	36
3.2.6. Evaluación y clasificación de COCs.....	36
3.2.7. Maduración in vitro de ovocitos.....	37
3.2.8. Fecundación in vitro.....	37
3.2.9. Cultivo in vitro y asignación de tratamientos	38
3.2.10. Congelación de blastocistos	38
3.2.11. Evaluación de la criosupervivencia embrionaria	39
3.2.12. Tinción de blastocistos.....	40
3.2.13. Variables de estudio y análisis estadístico	40
CAPITULO IV	42
4. RESULTADOS.....	42
CAPITULO V	45
5. DISCUSIÓN	45
CAPITULO VI	51
6. CONCLUSIONES	51
CAPITULO VII	51
7. RECOMENDACIONES	51
CAPITULO VIII	52
8. REFERENCIAS.....	52
CAPITULO IX	61
9. ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del producto sintético KnockOut™ Serum Replacement (las concentraciones no fueron especificadas).	24
Tabla 2. Características de embriones en diferentes de estadios de desarrollo.	28
Tabla 3. Composición del medio de maduración in vitro.	33
Tabla 4. Composición del medio de fecundación in vitro.	33
Tabla 5. Composición del medio de cultivo in vitro (SOF-CIT).	34
Tabla 6. Composición del medio HEPES-Fluido oviductal sintético.	34
Tabla 7. Efecto del Knockout Serum Replacement o del suero fetal bovino sobre el número y porcentaje de cigotos clivados y de diferentes categorías de embriones producidos.	42
Tabla 8. Efecto del Knockout Serum Replacement o del suero fetal bovino sobre el número de blastómeras totales y el número y porcentaje de blastómeras alteradas.	43
Tabla 9. Efecto del Knockout Serum Replacement o del suero fetal bovino sobre la reexpansión y eclosión de blastocistos a las 4, 24, 48 y 72 horas luego de la descongelación.	44

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Acondicionamiento de ovarios, recorte de tejido adyacente	61
Anexo 2.- Aspiración de folículos ováricos	61
Anexo 3.- Recuperación de complejos cúmulos ovocitos	62
Anexo 4.- Búsqueda y clasificación de ovocitos	62
Anexo 5.- Selección de ovocitos.....	62
Anexo 6.- Maduración de ovocitos	63
Anexo 7.- Selección espermática con columnas de percol	63
Anexo 8.- Determinación de la concentración espermática	63
Anexo 9.- Inseminación artificial de ovocitos	64
Anexo 10.- Desempaque de ovocitos	64
Anexo 11.- Determinación del clivaje a las 72 horas de cultivo.....	64
Anexo 12.- cuantificación de embriones de acuerdo al tipo de tratamiento	65
Anexo 14.- Congelacion de embriones en etilenglicol	65
Anexo 15.- Descongelación de embriones	66
Anexo 16.- Evaluacion de la reexpansión y ecloción 4 – 24 – 48 - 72 horas KSR	66
Anexo 17.- Evaluacion de la reexpansión y ecloción 4 – 24 – 48 - 72 horas SFB	66
Anexo 18.- Evaluacion de la reexpansión y ecloción 4 – 24 – 48 - 72 horas CONTROL	67
Anexo 19.- Tincion embrionaria diferencial hoechst y ioduro de propido para conteo de celulas totales y alteradas	67

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Hernán Eduardo Aguirre Durán en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **"Efecto del KnockOut™ Serum Replacement y del Suero Fetal Bovino en el cultivo y criotolerancia de embriones bovinos producidos in vitro"**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 06 de octubre de 2022



Hernán Eduardo Aguirre Durán

C.I: 010361973-0

Cláusula de Propiedad Intelectual

Hernán Eduardo Aguirre Durán, autor/a del trabajo de titulación "*Efecto del KnockOut™ Serum Replacement y del Suero Fetal Bovino en el cultivo y criotolerancia de embriones bovinos producidos in vitro*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca 06 de octubre de 2022



Hernán Eduardo Aguirre Durán

C.I: 010361973-0

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a la Universidad Estatal de Cuenca por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco también a mis suegros Julio y Paquita quienes, con su apoyo, fueron fundamentales para poder culminar con este sueño que también hoy es suyo y se vuelve una realidad.

A mis amigos Daniel y Juanita; gracias por el apoyo incondicional y por esa amistad sincera que nos lleve a perdurar por muchos años más gracias a ustedes hoy se vuelve realidad una meta y un sueño que se volvía casi imposible de cumplir gracias queridos amigos.

Finalmente quiero agradecer a mi querida tutora Dra. Silvana Méndez por el tiempo, dedicación y paciencia para poder terminar con mucho esfuerzo y a tiempo este trabajo.

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada principalmente a DIOS ya que gracias a Él he logrado concluir mi carrera, a mi amada esposa Gabriela Zúñiga por su sacrificio y esfuerzo. Por brindarme siempre su apoyo incondicional y siendo mi pilar en momentos de desertar siempre brindándome su amor, cariño y comprensión.

A mis amados hijos María Caridad, Zarah Valentina y Rafael Alejandro por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar hacia una vida con un mejor futuro.

A mis amados padres Hernán y Sara quienes con sus palabras de aliento nunca me dejaban decaer para que siguiera adelante y siempre sea perseverante con el cumplimiento de mis ideales ayudándome a crecer como persona y a luchar por lo que quiero gracias por enseñarme valores que me han llevado a alcanzar una gran meta los amo.

CAPITULO I**1. INTRODUCCIÓN**

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos se ha incrementado en la última década debido a su gran utilidad para diseminar germoplasma de vacas y toros genéticamente superiores (Viana et al., 2018). Su impacto en la industria de leche y carne ha sido muy importante y ha contribuido a aumentar la producción mundial de estos rubros alimenticios y sus derivados (Baruselli et al., 2019).

Aunque los sistemas de PIVE han ido mejorando a través de los años, la eficiencia de este sistema se mantiene por debajo del 40% (Lonergan y Fair, 2014). Si bien, aproximadamente el 90% de los ovocitos madurados *in vitro* (MIV) alcanzan la metafase II, y de éstos un 80% logran clivar (al menos a estadios de 2 células) luego de la fecundación *in vitro* (FIV), sólo entre 30 a 40% de estos ovocitos logran llegar al estadio de blastocistos al séptimo día post FIV (Lonergan et al., 2006).

Los sistemas de cultivo de embriones tienen gran influencia en la cantidad y calidad de embriones producidos y en su posterior criotolerancia (Rizos et al., 2001). Para simular las condiciones del ambiente uterino en las que ocurre el desarrollo temprano del embrión, los sistemas de cultivo *in vitro* (CIV) son suplementados con elementos inorgánicos y orgánicos; entre estos últimos se incluyen fuentes de energía y de proteína (Mucci et al., 2006a).

Como fuente de proteínas, se suele adicionar convencionalmente al medio de cultivo albúmina sérica bovina, ácido hialurónico, alcohol polivinílico o suero (Hasler, 2010); este último puede derivarse de fetos, terneros recién nacidos o de vacas (Mucci et al., 2006a). El suero contiene una gran variedad de componentes

(Van Langendonck et al., 1997), que han mostrado ser beneficiosos al promover el desarrollo embrionario (Pinyopummintr y Bavister, 1991).

Según evidencias, el suero fetal bovino (SFB) ejerce su efecto de un modo bifásico, inhibiendo el desarrollo de los primeros estadios embrionarios inmediatos a la fecundación, y estimulando el desarrollo de estadios posteriores (Pinyopummintr y Bavister, 1994). Uno de los inconvenientes de incluir suero en los medios de CIV es su efecto adverso en la viabilidad de los blastocitos luego que estos son criopreservados (Rizos et al., 2003; Mucci et al., 2006b). La inclusión de SFB en el medio de cultivo ha sido asociado a un incremento en el contenido de lípidos citoplasmáticos (Abe et al., 2002).

La criopreservación de blastocitos es una alternativa que utilizan los laboratorios comerciales para conservar embriones que exceden el número de receptoras disponibles para la transferencia directa. Además, constituye una alternativa para conservar gametos y embriones de hembras de alto valor genético para uso posterior (Rienzi et al., 2017). La criopreservación también se utiliza como método para evaluar la criotolerancia y viabilidad de blastocitos luego que estos son expuestos a diferentes sustancias que influencian su desarrollo durante el cultivo (Rizos et al., 2003; Sudano et al., 2011).

El aumento de los lípidos debido al SFB afecta la criotolerancia de los embriones luego de la criopreservación, reflejándose en un menor porcentaje de reexpansión y de eclosión de los blastocitos, así como también con un menor número de blastómeras viables y mayor tasa de apoptosis celular (Mucci et al., 2006a; Rizos et al., 2003; Sudano et al., 2011). Eso significa que la viabilidad embrionaria luego de la transferencia puede verse seriamente comprometida.

Como alternativa, se hace necesario usar medios químicamente definidos (Block et al., 2010).

El suero sintético KnockOut™ Serum Replacement está compuesto por cantidades definidas de aminoácidos, vitaminas, antioxidantes, proteínas y elementos traza, y constituye una alternativa para proveer una fuente conocida de proteínas y otras sustancias beneficiosas para el desarrollo embrionario.

La adición del KSR en el cultivo aumentó el número de células de embriones porcinos producidos *in vitro* y demostró una criotolerancia de blastocistos similar al SFB (Xiang et al., 2019). Asimismo, la adición de KSR al medio CIV el día 5 luego de la FIV, incrementó la proporción de blastocistos porcinos que eclosionaron, los cuales tuvieron mayor número de blastómeras y mayor contenido de ATP que los cultivados sin KSR o suplementados con 10% de KSR o 10% de SFB (Sakurai et al., 2015). En bovinos, el KSR al 5% demostró similar efectividad en la tasa de producción y eclosión de blastocistos como el SFB y la albúmina cuando se cultivó con 20% de O₂, (Mingoti et al., 2011).

Por tal motivo, la presente investigación planteó la suplementación del medio CIV con 5% de una fuente sintética de suero (KSR) con la finalidad de lograr una tasa de blastocistos similar o superior a las producidas después de suplementar o no con el 5% de SFB; y, además obtener una mayor criotolerancia de embriones criopreservados en comparación con medios suplementados o no con el 5% SFB, basado en re-expansión a las 2-24 y 48h de incubación y protrusión a las 12 y 24 h de incubación.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Evaluar dos fuentes de proteínas, uno sintético químicamente definido (KnockOut™ Serum Replacement) y otro de origen animal (SFB) sobre la producción y congelación de embriones bovinos producidos *in vitro*.

2.2. Específicos

- Evaluar el efecto del KSR y SFB sobre producción *in vitro* de blastocistos.
- Valorar la criotolerancia de embriones producidos *in vitro* con el producto KnockOut™ Serum Replacement.

2.3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿La suplementación del medio CIV con 5% de una fuente sintética de suero (KSR) permite lograr una tasa de blastocistos similar o superior a las producidas después de suplementar o no con el 5% de SFB?
2. ¿La suplementación del medio CIV con 5% de una fuente sintética de suero (KSR) permite obtener una mayor criotolerancia de embriones criopreservados en comparación con medios suplementados o no con el 5% SFB, basado en re-expansión a las 2-24 y 48h de incubación y protrusión a las 12 y 24 h de incubación?

CAPITULO II**1. REVISIÓN DE LITERATURA****2.1.1. Producción de embriones *in vitro***

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es una actividad biotecnológica que ha ganado gran importancia en la última década, debido a su potencial para impactar la calidad genética de los rebaños bovinos, por el uso de gametos de hembras y machos bovinos genéticamente superiores (Kasinathan et al., 2015, Sanches et al., 2019). Para el año 2018, del total de embriones transferibles colectados o producidos en el mundo (n=1.499.367), 31,3% fueron embriones obtenidos *in vivo* (n=469.967) y 68,7% fueron producidos *in vitro* (n=1.029.400) (IETS, Embryo Technology Newsletter, 2019).

Mientras que con métodos de reproducción convencional (ej. monta natural o inseminación artificial) la vaca puede producir solo una cría al año, la obtención de gran número de ovocitos mediante la aspiración transvaginal guiada por ultrasonido u ovum pick-up (OPU) ha permitido el nacimiento de numerosas crías de alto valor genético (Ferré et al., 2020). Asimismo, la posibilidad de combinar la PIVE con otras biotecnologías como el sexado de espermatozoides y la criopreservación de gametos y embriones, y la selección genómica ha hecho aún más útil esta actividad biotecnológica (Hansen, 2014; Ferré et al., 2020).

La PIVE implica la recolección de ovocitos de ovarios postmortem o de vacas vivas mediante OPU, en forma de complejos ovocito-células del cúmulo (COCs) (Ferré et al., 2020). El proceso comprende tres etapas: la maduración *in vitro* (MIV) de COCs, la fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos y el cultivo *in vitro* (CIV) de embriones (Gordon, 2003). El uso de COCs obtenido postmortem ha sido muy útil

como modelo experimental para estudiar diferentes protocolos y sistemas de PIVE (Manjunatha et al., 2008; Álvares et al., 2016), con el fin de mejorar la eficacia de esta biotecnología y poder aplicarla a una escala comercial (Sanches et al., 2019). Este último hecho fue posible luego que se implementara la tecnología OPU como método para obtener COCs de vacas de alto merito genético (Viana et al., 2018).

2.1.2. Maduración in vitro

Los COCs son colocados en un medio de maduración, cuya composición trata de imitar lo más posible las características químicas, físicas y fisiológicas del ambiente oviductal y fluido folicular. En el laboratorio, los COCs son cultivados en un ambiente a 38,5°C, con un 5% CO₂ y humedad de saturación, que promueve la maduración e implica que el ovocito avanza de un estado de profase I al de metafase II en un periodo de 20 a 24 horas (Gordon, 2003). Al completarse este periodo, puede observarse en el espacio perivitelino el primer corpúsculo polar, así como también la expansión de las células del cúmulo alrededor del ovocito. Paralelamente, el ovocito experimenta un proceso de maduración citoplasmática que implica el almacenamiento de lípidos, la distribución de mitocondrias y ribosomas, la reducción de aparatos de Golgi y la migración de los gránulos corticales (Ferreira et al., 2009). También se desarrolla un sistema de liberación de Ca²⁺, que es imprescindible para la fertilización, reinicio de la meiosis II y posterior desarrollo embrionario (Damiani et al., 1996).

Aunque hay diversas variantes en los medios MIV, la mayoría se basan en el uso de TCM-199 (tissue culture medium) buferado con bicarbonato o HEPES, y suplementado con SFB, hormonas (ej. estradiol, FSH, LH), antioxidantes (ej. cisteamina, melatonina), factores de crecimiento (ej. EGF, IGF-I), compuestos

químicos (ej. piruvato de sodio; L-glutamina) y antibióticos (ej. gentamicina) (Palma, 2001; Gordon, 2003).

2.1.3. Fecundación in vitro

Luego de completarse la maduración nuclear y citoplasmática, el ovocito está preparado para la fecundación. Este proceso implica la penetración de la zona pelúcida y la fusión de ambos gametos, que deben estar previamente preparados para ello. Para asegurar el éxito de la fecundación en condiciones in vitro, los COCs deben coincubarse con espermatozoides por 18 a 24 horas a 38,5°C, 5% CO₂ y humedad ≥ 92% (Palma, 2001), en un medio de fecundación que debe proveer las condiciones adecuadas para favorecer la penetración de los ovocitos por espermatozoides previamente capacitados (Ferré, 2017). Además, el medio FIV debe aportar las sustancias que soporten las funciones metabólicas de los gametos y proporcionen los elementos para estimular la capacitación y motilidad espermática, la fusión de los gametos y la fase inicial del desarrollo embrionario temprano (Gordon, 2003).

Algunos de los medios FIV usados a lo largo de los años han sido el formulado por Brackett y Oliphant (medio BO; Brackett y Oliphant, 1975), el TALP/FIV (tyrode's albumin lactate pyruvate médium; Parrish et al., 1986) el SOF/FIV (synthetic oviductal fluid; Holm, 1999), y el M199/FIV (Nedambale et al., 2006).

Antes de la FIV, los espermatozoides deben ser lavados para librarlos del líquido seminal y restos de diluyentes y crioprotectores, y someterlo a un procedimiento de selección para separar los espermatozoides móviles, de los inmóviles y muertos (Palma, 2001). Dos de los métodos de selección espermática

basados, uno en el principio de flotación, o *Swim-up*, y el otro por centrifugación en gradientes de densidad, han sido usados con éxito por muchos años (Parrish et al., 1995).

La capacitación espermática es el proceso biológico a través del cual los espermatozoides adquieren la capacidad fecundante, y en condiciones naturales ocurre por la interacción de los gametos masculino y femenino en el tracto genital de la hembra. Este proceso incluye varios sucesos como la hiperactivación de la motilidad y la capacidad de responder a señales provenientes del ovocito (Ferré, 2017).

En condiciones *in vitro*, sin embargo, este proceso es inducido mediante la adición de sustancias capacitantes como la cafeína y heparina etc., siendo esta última sustancia la que más ha sido usada debido a su potente efecto estimulante de la capacitación (Handrow et al., 1982). Previa inseminación de las gotas de medio FIV con los COCs, se debe calcular la concentración final de espermatozoides, para estimar la dosis de inseminación que oscila entre 1 y 5 millones de espermatozoides de acuerdo al método, la raza y la aptitud individual del toro (Palma, 2001) y el tipo de semen usado (convencional o sexado) (Ferré et al., 2020). Luego de la FIV las células de cúmulo son removidas, generalmente por métodos mecánicos y/o enzimáticos. La tasa de fecundación puede ser determinada a las 48 horas de la FIV, cuantificando la proporción de estructuras clivadas (Palma, 2001).

2.1.4. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de los presuntos cigotos se inicia a las 24 horas de haber comenzado la FIV. Estas estructuras deben ser lavadas varias veces para

remover el medio FIV y los espermatozoides suspendidos en él. La tasa de fecundación es determinada a las 48 horas de la FIV, cuantificando la proporción de estructuras clivadas (Palma, 2001). Esta es la fase más crítica de la PIVE, ya que como si indicó anteriormente, aunque alrededor de 90 de los ovocitos de buena calidad maduran, y entre el 60 y 80% son fecundados, solo se obtiene entre 30 y 40% de blastocistos en las mejores condiciones (Lonergan et al., 2006). Esta situación pudiera ser causada por las diferencias en la actividad metabólica del cigoto y primeros estadios embrionarios y los de la mórlula compacta y blastocisto (Ferré, 2017).

Los medios CIV son soluciones de compuestos orgánicos e inorgánicos formuladas con características biofísicas particulares, para proveer todas las sustancias y condiciones que requiere el embrión en los diferentes estadios de desarrollo hasta blastocisto (Mucci et al., 2006b). La composición de estas soluciones se fue dilucidando en la medida en que fue comprendiéndose la fisiología del embrión y su metabolismo, así como también las características del fluido oviductal y uterino (Ferré, 2017).

Luego de la FIV, los presuntos cigotos son incubados durante 6 días a 38,5°C en atmósfera humidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ (Gordon, 2003). Los medios CIV, deben tener una osmolaridad y pH entre parámetros similares a los encontrados en los fluidos oviductal y uterino. Aunque son varios los medios que se han usado a lo largo de tiempo, en la actualidad uno de los más frecuentes y exitosos es el SOF suplementado con piruvato, glutamina, citrato de sodio, mioinositol y aminoácidos esenciales y no esenciales (Palma, 2001). Además de los aminoácidos mencionados, que son imprescindibles para el desarrollo del

embrión, los medios CIV han sido suplementados con fuentes adicionales de proteínas de las cuales se desconoce su composición exacta (Hasler, 2010); sin embargo, su uso ha sido controvertido como se describe a continuación.

2.1.4.1. Fuentes de proteínas en los medios de cultivo

Como se indicó previamente, los medios de CIV para PIVE son elaborados con aminoácidos esenciales y no esenciales, en concentraciones conocidas que son usados por el embrión como fuente de energía, para síntesis de proteínas y para contribuir a regular el pH del medio. Según evidencias, las células del trofoblasto utilizan principalmente aminoácidos no esenciales y glutamina, mientras que las células de la masa celular interna usan principalmente aminoácidos esenciales (Gardner y Lane, 1998).

Se han utilizado también en los medios CIV fuentes de proteínas como la BSA y el SFB. La BSA es una proteína muy abundante del suero sanguíneo que cumple un importante rol como proteína transportadora; también es muy abundante en el fluido oviductal (Mucci et al., 2006b). El suero, en general, y el SFB en particular, es fuente de macromoléculas proteicas, pero también de aminoácidos, factores de crecimiento, electrolitos, vitaminas y sustratos energéticos, cuyas concentraciones pueden variar por numerosas causas (Van Langendonck et al., 1997). Según Mucci et al. (2006b), algunos de los beneficios que justificarían el uso de estas dos fuentes de proteínas en el CIV son: 1) protegen a los embriones de ciertas sustancias tóxicas; 2) aportan algunos factores de crecimiento y vitaminas que podrían promover el desarrollo embrionario; 3) reducen la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran a las placas de cultivo, tubos, pipetas, etc. No obstante,

debido a la presencia de sustancias no conocidas en ambas fuentes proteicas algunos de sus efectos son poco comprendidos (Mucci et al., 2006b).

Los primeros estudios que utilizaron suero a principios de los años de 1990 demostraron dos hechos: que su adición en el medio de cultivo incrementa la producción de blastocistos con respecto a los medios no suplementados (Pinyopummmintr y Bavister, 1991; Pinyopummmintr y Bavister, 1994), y que su efecto sobre el desarrollo embrionario es bifásico, porque suprime el desarrollo de los primeros estadios y estimula el desarrollo de mórulas y blastocistos (Pinyopummmintr y Bavister, 1994).

La adición de BSA, SFB o la combinación de ambos (BSA/SFB) al medio SOFaa demostró el efecto beneficioso del suero sobre la producción de blastocistos, cuya presencia (grupos SFB y BSA/SFB) incrementó más de tres veces la tasa de blastocistos que el medio con BSA (Thompson et al., 1998). En un estudio similar en el que se usó el medio CR1 suplementado con BSA, o con suero de vaca en celo (SVC) o con la combinación de ambas fuentes proteicas (BSA/SVC), las tasa de blastocistos, la proporción de blastocistos grado 1 o 2, el número total y el número de blastómeras con membrana plasmática alterada no variaron entre tratamientos (Mucci et al., 2006a). Sin embargo, luego de la criopreservación, significativamente una menor proporción de blastocistos re-expandieron y eclosionaron en los grupos de embriones suplementados con suero que en los suplementados con BSA. Estos últimos, además, tuvieron un número menor de células con la membrana plasmática alterada luego de la criopreservación (Mucci et al., 2006a).

Hallazgos similares fueron reportados previamente, una mayor producción de blastocistos en el día 6 en los cultivos suplementados con SFB que con BSA, que fue similar entre grupos a los 7 y 9 días (Rizos et al., 2003). No obstante, el hallazgo más importante fue que luego de la vitrificación los embriones expuesto al SFB tuvieron una expresión significativamente mayor de ARNm para genes asociados a la apoptosis, estrés oxidativo, diferenciación e implantación, mientras que redujo los asociados con la implantación y la comunicación a través de uniones gap (Rizos et al., 2003). Aparentemente, la menor crioresistencia de los embriones expuestos al suero durante la etapa de desarrollo hasta blastocistos se debe a que acumulan más lípidos intracitoplasmáticos que sus contrapartes cultivados sin suero (Sudano et al., 2011). La acumulación de lípidos ocurre en respuesta al exceso de actividad glucolítica causada por el aumento de las concentraciones celulares de los precursores de la síntesis de lípidos (Rieger, 1992). Aunque el SFB pueda mejorar la producción de embriones transferibles como se demostró en algunos estudios, el deterioro que causa en la criotolerancia afecta a los laboratorios comerciales de PIVE, que, en muchas ocasiones, debido a la producción de gran número de embriones, o a la no disponibilidad de suficientes vacas receptoras para hacer las transferencias de embriones en fresco, se ven obligadas a criopreservarlos.

Una alternativa al uso de SFB en los medios CIV es sustituirlo por formulaciones comerciales que contengan proteínas conocidas en concentraciones determinadas. Actualmente existe un producto conocido como KnockOut™ Serum Replacement (KSR) que pudiera cumplir esta función. Este es un producto sintético con numerosas sustancias y fuente de proteínas que ha sido usado con frecuencia en el proceso de derivación *in vitro* de células madre

pluripotentes (Petkov et al., 2008; Aoshima et al., 2013). Los componentes del KSR están descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del producto sintético KnockOut™ Serum Replacement (las concentraciones no fueron especificadas).

Componentes	Ingredientes
Amino Ácidos	Glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-hidroxiprolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tyrosina, L-valina
Vitaminas y antioxidantes	Tiamina, glutatión reducido, ácido ascórbico
Elementos traza	Ag ⁺ , Al ³⁺ , Ba ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cr ³⁺ , Ge ⁴⁺ , Se ⁴⁺ , Br ⁻ , I ⁻ , F ⁻ , Mn ²⁺ , Si ⁴⁺ , V ⁵⁺ , Mo ⁶⁺ , Ni ²⁺ , Rb ⁺ , Sn ²⁺ , Zr ⁴⁺
Proteínas	Transferrina, insulina, albumina

Fuente: Price et al. (1998)

En el único estudio en bovinos en que utilizaron KSR y probaron otras fuentes de proteínas (BSA, SFB, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, Ficoll) suplementadas en el medio de cultivo en dos presiones de oxígeno (5 y 20%), encontraron que en un ambiente con 20% de oxígeno KSR fue capaz de reemplazar al suero y a la albúmina en el medio de cultivo (Mingoti et al., 2011).

Otros estudios en porcinos demostraron que la adición de 5% de KSR en el medio CIV en el día 5 de la FIV, incrementó el porcentaje de blastocistos porcinos que eclosionaron (Sakurai et al., 2015), y que tuvieron mayor número de blastómeras y mayor contenido de ATP que los cultivados sin KSR o los suplementados con 10% de KSR o 10% de SFB (Sakurai et al., 2015). En un estudio más reciente, se usó KSR en el medio de calentamiento luego de la vitrificación, y se observó una efectividad similar al SFB en la producción de blastocistos producido por partenogénesis, que tuvieron menos daño de la membrana plasmática, menor porcentaje de especies reactivas de oxígeno y

mayor actividad mitocondrial que los no suplementados (Xiang et al., 2019). Los resultados indicados por Mingoti et al. (2011) en bovinos, y los hallazgos más recientes en porcinos (Sakurai et al., 2015; Xiang et al., 2019) hacen suponer que el KSR pudiera sustituir al SFB, sin perjuicio de la calidad embrionaria luego de la criopreservación, constituyendo una alternativa para mejorar los sistemas PIVE y las tasas de preñez con embriones criopreservados.

2.1.5. Criopreservación de embriones

Los embriones pueden ser criopreservados mediante congelación lenta y por vitrificación. En el primer procedimiento, la disminución de temperatura se hace a un ritmo que permite a las células responder osmóticamente a la deshidratación, de modo que la temperatura se reduce gradualmente, con un periodo crítico en el que se aplican velocidades de enfriamiento extremadamente lentas (0,5 °C/min) hasta los -50 °C, que luego se incrementan hasta alcanzar los -150 °C, para luego sumergirse en nitrógeno líquido (Lluisupa Landin, 2015). Para evitar que se formen cristales de hielo que destruyan las células, los embriones son tratados con crioprotectores de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular (Ej. glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido)

En el segundo procedimiento, en cambio, la criopreservación se lleva a cabo una velocidad extremadamente rápida, para lo cual los embriones son expuestos a concentraciones muy elevadas de crioprotectores de alto peso molecular (no permeables a través de la membrana plasmática) y luego sumergidos directamente en nitrógeno líquido. Con este procedimiento se logra la solidificación de la solución crioprotectora debido al aumento extremo de la

viscosidad durante el proceso de vitrificación sin que ocurra formación de cristales de hielo (Silva y Berland, 2004).

2.1.6. Evaluación del desarrollo y calidad embrionaria

2.1.6.1. Estadio de desarrollo embrionario

Luego de la fecundación y fusión de los pronúcleos de la hembra y del macho, el huevo o cigoto inicia un período de divisiones mitóticas sucesivas que ocurren aproximadamente cada 24 horas. Este proceso, conocido como segmentación o clivaje, conduce a la formación de un blastocisto, que es el estadio embrionario previo a la implantación (Hytell et al., 2010).

En los bovinos, el período de cultivo embrionario es de 6 días, sin embargo, si toma en cuenta desde el momento de la fecundación, la cual ocurre pocas horas de iniciada la FIV (Gordon, 2003), transcurren aproximadamente 7 días hasta la formación de los blastocistos, momento en que los de mejor calidad son transferidos a hembras receptoras o criopreservados para uso posterior (Bo y Mapletoft, 2013). Sin embargo, no todos los embriones se desarrollan a la misma velocidad durante ese período, de modo que en el día 7 post-FIV habrá mórulas, blastocistos tempranos, blastocistos regulares, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados en el medio de cultivo. Conforme aumenta la proporción de embriones en estadios avanzados de desarrollo en el día 7, mejor es el sistema *in vitro* utilizado. Sin embargo, el período de cultivo luego de la FIV es la fase más crítica que determina la calidad de los blastocistos (Lonergan et al., 2003). La Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS, 2009) describió nueve estadios de desarrollo embrionario a los que designó códigos, seis de los cuales son caracterizados en la Tabla 2.

2.1.6.2. Calidad embrionaria

En base en las características morfológicas de los embriones, la IETS (2009) categorizó la calidad en 4 grados:

1. **Excelente o bueno.** Presentan una masa celular simétrica y esférica. Blastómeras individuales uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con la etapa de desarrollo esperada. Las irregularidades deben ser menores y al menos el 85% del material celular debe estar intacto. La zona pelúcida debe ser lisa y no tener en la superficie irregularidades que faciliten que el embrión se adhiera a las pajuelas. Los embriones grado 1 se denominan embriones transferibles.
2. **Aceptables o regulares.** Presentan irregularidades moderadas en la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta. La supervivencia de estos embriones al procedimiento de congelación/descongelación es menor que la de los embriones de grado 1, pero las tasas de preñez son adecuadas si los embriones se transfieren en fresco a receptoras adecuadas. Estos embriones se consideran transferibles, pero no congelandos.
3. **Malos.** Presentan importantes irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las blastómeras. Al menos el 25% de la masa embrionaria debe estar intacta. Estos embriones no sobreviven a la congelación/descongelación y las tasas de preñez son inferiores a las obtenidas con embriones de calidad regular si se transfieren en fresco.
4. **Muertos o degenerados.** Pueden ser embriones, ovocitos o embriones de una célula. No son viables y deben descartarse.

Tabla 2. Características de embriones en diferentes estadios de desarrollo.

Estadio de desarrollo	Código	Características
Mórula	3	<i>Masa de al menos 16 células. Blastómeras individuales difíciles de diferenciar unas de otras. La masa celular del embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.</i>
Mórula compacta	4	<i>Los blastómeras forman una masa compacta, que ocupa entre el 60 y 70 % del espacio perivitelino</i>
Blastocisto temprano	5	<i>El embrión ha formado una cavidad llena de líquido o blastocele. Este ocupa entre el 70 y el 80% del espacio perivitelino.</i>
Blastocisto regular	6	<i>Hay pronunciada diferenciación de la capa externa del trofoblasto y de la masa celular interna. El blastocele es muy prominente y el embrión ocupa la mayor parte del espacio perivitelino. En este estadio embrionario es posible diferenciar el trofoblasto y la masa celular interna.</i>
Blastocisto expandido	7	<i>El diámetro del embrión esta aumentado considerablemente, con un adelgazamiento de la zona pelúcida de aproximadamente un tercio de su grosor original</i>
Blastocisto eclosionado	8	<i>Los embriones pueden estar en proceso de eclosión o haber perdido completamente la zona pelúcida. Estos blastocistos pueden ser esféricos con un blastocele bien definido o pueden estar colapsados.</i>

La mejor forma de evaluar la calidad de los embriones producidos in vitro y, por lo tanto, la eficiencia del sistema in vitro, es la transferencia a hembras receptoras. Sin embargo, esto requiere de animales, recursos y tiempo, y con

frecuencia no es posible efectuarlas. Otra forma de comprobar la calidad de los embriones es estimar la sobrevivencia luego de la criopreservación (Rizos et al., 2008). En ese caso, los embriones son descongelados o desvitrificados e incubados por 48 o 72 horas (Rizos et al., 2003; Mucci et al., 2006a). Durante este periodo se determina la proporción de blastocistos que reexpanden y/o eclosionan en tiempos determinados, por ejemplo, a las 4, 12, 24, 48 y 72 horas luego de la criopreservación.

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Físicos

- Cooler
- Guantes de examinación
- Papel secante
- Equipo de disección

3.1.2. Biológicos

- Ovarios bovinos
- Ovocitos bovinos
- Semen bovino criopreservado

3.1.3. De laboratorio

Descartables

- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)
- Tubos Falcon de 15 ml
- Placas Petri de 100 mm
- Placas de cultivo de 35 mm
- Tubos cónicos de 1,5 ml
- Capilares Drummond
- Jeringas desechables
- Agujas de 20 Gauss x 1,5 pulgadas
- Filtros de jeringa (25 mm de diámetro; poro de 0.20 µm)

Instrumentos

- Pipetas automáticas (0 -20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl)
- Balanza analítica

- Peachímetro
- Osmómetro

Equipos

- Microscopio estereoscópico
- Microscopio de campo claro
- Cámara de flujo laminar
- Platina térmica
- Microcentrífuga
- Baño María
- Incubadoras Memmert (CO₂ y Trigas)
- Congelador de embriones
- Refrigeradora
- Congeladora (-20°C)

3.1.4. Químicos y biológicos

- L-Glutamina
- FSHp (Folltropin, Vetoquiol)
- Estradiol
- Cisteamina
- Lactato sódico
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)
- BSA sin ácidos grasos
- Piruvato de sodio
- Solución PHE (2 mM penicilamina, 1 mM hipotaurina, y 250 µM epinefrina)
- Heparina
- Gentamicina
- Agua probada para embriones, csp
- Glutamina
- Cloruro de sodio

- Fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4)
- Sulfato de magnesio $7\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de calcio $2\text{ H}_2\text{O}$ ($\text{CaCl}_2 \text{ H}_2\text{O}$)
- Cloruro de Magnesio $6\text{ H}_2\text{O}$ ($\text{MgCl}_2 \text{ 6H}_2\text{O}$)
- Citrato trisódico
- Mioinositol
- BSA-FAF
- MEM aminoácidos
- BME aminoácidos
- BSA-F
- Aceite mineral
- KnockOut Serum Replacement (Gibco™)
- Suero fetal bovino

3.2. Metodología

3.2.1. Área de estudio

Los ovarios bovinos fueron recolectados en el Camal Municipal de la ciudad de Cuenca y transportados al Laboratorio Singamia, localizado en la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay, donde se realizó la colección y clasificación de ovocitos, y la posterior maduración, fecundación, cultivo *in vitro*. La congelación y descongelación de embriones, y la evaluación de la viabilidad embrionaria post-congelación también se llevó a cabo en este laboratorio. La doble tinción fluorescente se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, situado en la Granja Irquis; y el conteo de células se realizó en el laboratorio Singamia.

3.2.2. Elaboración y composición de los medios

Los medios usados en esta investigación fueron fabricados en el laboratorio Singamia. Los reactivos para la elaboración de medios son de Sigma-Aldrich y Merk. En las Tablas 3, 4, 5 y 6 se describe la composición de los medios de maduración, fecundación, cultivo *in vitro* y HEPES-fluido oviductal sintético (hSOF). Todos los reactivos para la elaboración de los medios fueron pesados en la balanza analítica en estrictas condiciones de asepsia. Cada medio fue elaborado en la campana de flujo laminar y luego chequeado su pH y osmolaridad. Los medios fueron filtrados, envasados y refrigerados hasta su uso.

Tabla 3. Composición del medio de maduración *in vitro*.

Reactivos	Cantidad
TCM-199 + 10 ng /mL EGF + 10% (v/v) SFB, csp	Cantidad a requerir
FSH _p	25 UI/mL
Estradiol	1 µg/mL
Cisteamina	100 µM
Gentamicina	50 µg/mL

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

Reactivos	Cantidad
Medio FERT-TALP	
Lactato sódico	13 mM
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	25 mM
BSA sin ácidos grasos	6 mg/mL
Piruvato de sodio	0.2 mM
Solución PHE (2 mM penicilamina, 1 mM hipotaurina, y 250 µM epinefrina)	40 µL/mL
Heparina	10 µg/mL
Gentamicina	50 µg/mL
Agua probada para embriones, csp	Cantidad a requerir

Tabla 5. Composición del medio de cultivo in vitro (SOF-CIT).

Reactivos	Cantidad
Medio SOF-CIT	
Glutamina	0,20 mM
Cloruro de sodio	107,63 mM
Cloruro de potasio	7,16 mM
Fosfato ácido de potasio (KH ₂ PO ₄)	1,19 mM
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	1,51 mM
Cloruro de calcio 2 H ₂ O (CaCl ₂ H ₂ O)	1,78 mM
Bicarbonato de potasio (NaHCO ₃)	25 mM
Lactato de sodio	5,3 mM
Gentamicina	50 µg/mL
Piruvato de sodio	7,27 mM
Citrato trisódico	0,34 mM
Mioinositol	2,77 mM
BSA-FAF	4 mg/mL
MEM aminoácidos	10 µL/mL
BME aminoácidos	30 µL/mL
BSA-FAF	6 mg/mL
Gentamicina	50 µg/mL
Mioinositol	2,77 mM
Agua probada para embriones, csp	Cantidad a requerir

Tabla 6. Composición del medio HEPES-Fluido oviductal sintético.

Reactivos	Cantidad
Cloruro de sodio	107,63 mM
Cloruro de potasio	7,16 mM
KH ₂ PO ₄	0,29 mM
Bicarbonato de sodio	5 mM
Hepes AF	10 mM
Hepes SS	10 Mm
Piruvato de sodio	7,27 mM
BSA FAF	3mg/ mL
Cloruro de calcio 2H ₂ O	1,71
Lactato de sodio 60%	5,35 Mm
Gentamicina	50 µg/ mL
Agua Ultrapura	Cantidad suficiente

3.2.3. Diseño experimental

Una vez obtenidos y clasificados, los COCs de categoría 1 y 2 ($n = 1798$) fueron madurados por 24 horas a 38,5°C, en un ambiente con 5% de CO₂ y humedad de saturación. Luego fueron co-incubados con espermatozoides por 22-24 horas en similares condiciones. Los presuntos cigotos fueron divididos aleatoriamente en tres grupos e incubados por 6 días (38,5°C, 5% de CO₂, 5% de N₂ y humedad de saturación) en un medio de cultivo *in vitro* suplementado con: 1) 0,6% de albúmina sérica bovina (BSA); 2) 5% de suero fetal bovino (SFB); y 3) 5% de Knockout Serum Replacement (KSR). En el día 7 luego de la fecundación *in vitro*, los embriones fueron evaluados y categorizados en mórlulas, blastocistos tempranos, blastocistos regulares, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados. Los embriones grado 1 fueron congelados, y luego de un periodo de al menos 30 días, descongelados. Una muestra de estos fueron sujetos a una doble tinción fluorescente (yoduro de propidio y Hoechst 33342) y cuantificadas las blastómeras con la membrana plasmática intacta y alterada. El segundo grupo de embriones congelados/descongelados fueron incubados por 72 horas para determinar las tasas de reexpansión y eclosión a las 4, 24, 48 y 72 horas. El estudio se completó en 13 repeticiones.

3.2.4. Recolección de ovarios

Los ovarios se obtuvieron en el Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP). Luego del sacrificio, los ovarios fueron removidos y almacenados en un termo con suero fisiológico suplementado con gentamicina atemperado a 25-30°C, y transportados al laboratorio Singamia en un tiempo no mayor a 3 horas. En el

laboratorio se removieron los tejidos adyacentes de los ovarios, y estos se lavaron varias veces en suero fisiológico a 37,5°C hasta quedar libre de sangre y detritos.

3.2.5. Obtención de ovocitos

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

Los ovocitos, que se acumularon por decantación formado un pellet en el fondo cónico del tubo, se recuperaron con una pipeta Pasteur luego de eliminarse el sobrenadante. Los COCs se depositaron en una placa Petri de 100 mm de diámetro para la búsqueda, identificación y selección de COCs, bajo la luz de un microscopio estereoscópico (Olympus, SZ61, Japón). Los COCs seleccionados se transfirieron a 5 gotas de 200 µL de medio hSOF con el fin de lavarlos y librarlos de restos celulares.

3.2.6. Evaluación y clasificación de COCs

Los COCs fueron clasificados en tres categorías según el criterio indicado por Hawk y Wall (1994): 1) COCs con varias capas compactas de células del cúmulo, zona pelúcida intacta, citoplasma homogéneo, denso y finamente granulado; 2) COCs con dos o más capas compactas de células del cúmulo que cubrían totalmente o al menos la mitad de zona pelúcida intacta, con un citoplasma menos homogéneo, cuyos gránulos varían desde uniformes, densos y finamente granulados hasta gránulos de tamaño moderado; 3) COCs con células del cúmulo parcial o totalmente expandidas, o de color anormal (negro o marrón claro),

ovocitos excepcionalmente grandes o pequeños o con signos de degeneración.

En este estudio se utilizaron únicamente COCs de categoría 1 (buena calidad) y 2 (calidad intermedia).

3.2.7. Maduración *in vitro* de ovocitos

Luego de ser clasificados, entre 20 y 25 COCs se colocaron en microgotas de 90 µL de medio de maduración, cubiertas de aceite mineral, y se incubaron (Memmert, ICOmed, Alemania) durante 24 horas a 38,5°C, en un ambiente con 5% de CO₂ y humedad de saturación máxima. En la Tabla 3 se indica la composición del medio de maduración.

3.2.8. Fecundación *in vitro*

Una vez lavados varias veces en medio hSOF, los COCs madurados *in vitro* fueron transferidos a gotas de 90 µL (20-25 COCs por gota) de medio de fecundación (cubiertas con aceite mineral) suplementado con heparina, y co-incubados con espermatozoides bovinos (1×10^6 espermatozoides/ml en cada microgota) en la incubadora de CO₂ durante 22-24 horas, en un ambiente a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad de saturación. En la Tabla 4 se indica la composición del medio de fecundación (FERT-TALP).

Previo a la inseminación de las gotas de medio FIV con los COCs, el semen descongelado fue sujeto a un proceso de selección espermática mediante columnas de Percoll, con la finalidad de usar los espermatozoides de mejor calidad en la fecundación. Una vez realizado el procedimiento anterior, se calculó la concentración espermática con una cámara de Neubauer y se estimó una dosis inseminante de alrededor de un millón de espermatozoides por ml.

3.2.9. Cultivo *in vitro* y asignación de tratamientos

Luego del periodo de FIV, las células del cúmulo de los presuntos cigotos se removieron mecánicamente, y estos se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos con número similar de estructuras (20-25 por gota) en microgotas de 50 μL de medio de cultivo (Tabla 5). Los grupos se conformaron por la suplementación del medio de cultivo con: 1) 0,6% de albúmina sérica bovina (**BSA**; n = 491); 2) 5% de suero fetal bovino (**SFB**; n = 406); y 3) 5% de Knockout Serum Replacement (**KSR**; n = 428). Luego las placas con las gotas de cultivo se colocaron en una incubadora triges (Memmert, ICO50med, Alemania), a un temperatura de 38,5°C, 5% de N₂, 5% de CO₂ y humedad de saturación por seis días.

A las 48 horas después de la FIV, se evaluaron las placas de cultivo para conocer cuántos embriones habían avanzado a estadios de dos o más células, y se registró cuantos habían clivado. En el día 7 de iniciada la FIV, los embriones fueron evaluados y, de acuerdo al estadio de desarrollo según la clasificación establecida por la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS, 2009), se categorizaron en mórlulas (M), blastocistos tempranos (BT), blastocistos regulares (BR), blastocistos expandidos (BEx) y blastocistos eclosionados (BE). Asimismo, de acuerdo a las características morfológicas (IETS, 2009), se identificaron los blastocistos de calidad 1 (grado 1), los cuales se congelaron para uso posterior, como se describe a continuación.

3.2.10. Congelación de blastocistos

Luego de la evaluación y clasificación de embriones, los blastocistos de calidad 1 se sometieron a un protocolo de congelación lenta. Primero, los

embriones se colocaron en una solución comercial de etilenglicol (EG; Ethylene Glycol Freeze Plus, ViGRO™, Vetoquinol, Canadá) por 10 minutos a temperatura ambiente. Cada embrión fue envasado en una pajuela de 0,25 ml de la manera siguiente: columna central de solución de EG con el embrión, dos columnas de solución en cada extremo de la pajuela separadas de la columna central por una capa de aire. Las pajuelas fueron selladas por calor.

Segundo, las pajuelas con los embriones se colocaron en una congeladora (Freeze Control, Modelo CL 5500; Cryologic, Australia) previamente estabilizada a -6°C por 10 minutos (Sena-Netto et al., 2020). A los dos minutos de iniciarse el conteo, se realizó el seeding (o cristalización) en una de las columnas adyacentes a la que contenía el embrión. Tercero, los embriones fueron sometidos a una velocidad de enfriamiento de 0,5°C por minuto hasta llegar a -35°C, temperatura en la que permanecieron durante 10 minutos. Inmediatamente fueron sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a -196°C hasta su uso posterior.

La descongelación se llevó a cabo colocando las pajuelas a temperatura ambiente (15 a 18 °C) durante 10 segundos y luego sumergiéndolas en un baño María a 30°C por 20 segundos adicionales (Sena-Netto et al., 2020).

3.2.11. Evaluación de la criosupervivencia embrionaria

Luego de al menos 30 días de haber sido congelados, una muestra de embriones de los grupos BSA (n = 50), SFB (n = 43) y KSR (n = 59) se descongelaron, transfirieron a gotas de 100 µL de medio de cultivo cubiertas con aceite mineral, y se incubaron 38,5°C durante 72 horas (5% de N₂, 5% de CO₂ y humedad de saturación). A las 4, 24, 48 y 72 horas de incubación, se determinó el número de blastocistos que habían re-expandido y eclosionado en cada grupo.

3.2.12. Tinción de blastocistos

Otra muestra de blastocistos de los grupos BSA (n = 19), SFB (n = 18) y KSR (n = 20) se descongelaron y sometieron a una doble tinción fluorescente con el fin de cuantificar las células con membrana plasmática intacta y alterada, como lo describió Ríos et al. (2010). Brevemente, luego de la descongelación los embriones fueron lavados dos veces en medio de cultivo para retirar la solución de congelación. Estos se incubaron a 38,5°C en medio de cultivo suplementado con 10^{-1} mg/mL de ioduro de propidio durante 15 minutos en un ambiente de 5% CO₂ y humedad de saturación. A continuación, los embriones se fijaron con etanol 70% por 5 minutos y se transfirieron a gotas de etanol absoluto con 10^{-1} mg/mL de bisbenzeimida (Hoechst 33342) por 5 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Los embriones fueron colocados entre cubre y porta objetos con una gota de glicerol, y se sellaron ambas láminas con esmalte de uñas para su preservación. Las células teñidas de azul (intactas) y rojo (alteradas) se cuantificaron bajo la luz de un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse Ci-E) a una longitud de onda de 405 nm.

3.2.13. Análisis estadísticos

Los datos se tabularon en hojas Excel y se analizaron estadísticamente con el programa SAS (SAS®; Version 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Se aplicó un modelo lineal completamente aleatorizado. Como variables dependientes del objetivo específico 1 se consideraron: 1) el número y proporción de cigotos clivados (día 2 post-FIV) y 2) el número y proporción de embriones en diferentes estadios de desarrollo (M, BT, BR, BEx, BE) (día 7 post-FIV). Como variables dependientes del objetivo específico 2 se consideraron: 1) proporción de

blastocistos que luego de la descongelación expandieron y eclosionaron a las 4, 24, 48 y 72 horas; 2) número total de blastómeras; 2) número de blastómeras con la membrana plasmática intacta (azules); 3) número y proporción de blastómeras con la membrana plasmática alterada (rojas). Como variables independientes se consideraron el grupo experimental (BSA, SFB, KSR) y la repetición (n=13). Las variables numéricas se transformaron al *Logaritmo 10* y las porcentuales al *Arcoseno*. Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza utilizando el modelo lineal general (GLM). Las medias se compararon mediante el método de los mínimos cuadrados (LSM). Se consideraron significativos los valores de P<0.05, y tendencia los comprendidos entre 0,051 y 0,10.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS

En general, se colectaron 1798 COC's aptos para la MIV. El número de ovocitos que clivaron luego de la FIV fue significativamente superior en el grupo BSA que en SFB, pero similar a KSR (Tabla 7). Aunque el número de embriones por maniobra fue estadísticamente similar entre tratamientos, en los grupos SFB y KSR se produjeron menos mórulas que en el grupo BSA.

Tabla 7. Efecto del Knockout Serum Replacement o del suero fetal bovino sobre el número promedio de cigotos clivados y de diferentes categorías de embriones producidos.

Estructuras (n)	Tratamientos (promedio ± error estándar)					
	BSA		SFB		KSR	
	n	%	n	%	n	%
Ovocitos	654	36,4	555	30,8	589	32,7
Clivados	$37,8 \pm 2,0^a$	$75,2 \pm 1,5$	$31,7 \pm 2,0^b$	$73,1 \pm 1,5$	$33,2 \pm 2,0^{a,b}$	$72,7 \pm 1,5$
Embriones	$9,1 \pm 1,0$	$17,8 \pm 1,8$	$9,0 \pm 1,0$	$21,3 \pm 1,0$	$9,4 \pm 1,0$	$21,9 \pm 1,0$
Mórulas	$2,8 \pm 0,4^b$	$5,9 \pm 0,9^A$	$1,1 \pm 0,4^{c,d}$	$2,5 \pm 0,9^{B,C}$	$1,6 \pm 0,4^d$	$3,5 \pm 0,9^C$
Blastocistos	$7,2 \pm 1,0$	$14,2 \pm 2,0^C$	$8,7 \pm 1,0$	$21,2 \pm 2,0^{D,E}$	$8,1 \pm 1,0$	$19,0 \pm 2,0^E$
tempranos	$1,2 \pm 0,3$	$8,9 \pm 2,6$	$1,3 \pm 0,3$	$11,8 \pm 2,6$	$0,8 \pm 0,3$	$9,1 \pm 2,6$
regulares	$2,1 \pm 0,4$	$23,1 \pm 2,0^{F,H}$	$2,8 \pm 0,4$	$39,2 \pm 2,0^G$	$2,0 \pm 0,4$	$22,3 \pm 2,0^H$
expandidos	$3,0 \pm 0,6^{f,g}$	$33,9 \pm 3,8^{H,I}$	$3,7 \pm 0,6^{g,h}$	$38,0 \pm 3,8^I$	$4,9 \pm 0,6^h$	$50,7 \pm 3,8^J$
eclosionados	$0,9 \pm 0,2$	$12,1 \pm 3,3$	$0,8 \pm 0,2$	$9,4 \pm 3,3$	$0,3 \pm 0,2$	$3,2 \pm 3,3$
E. agrupados						
M + BT	$4,1 \pm 0,5^h$	$42,9 \pm 4,0^J$	$2,3 \pm 0,5^{i,j}$	$22,7 \pm 4,0^{K,L}$	$2,4 \pm 0,5^j$	$26,9 \pm 4,0^L$
BEx + BE	$3,9 \pm 0,7$	$46,0 \pm 4,0^A$	$4,6 \pm 0,7$	$47,5 \pm 4,0^A$	$5,2 \pm 0,7$	$54,0 \pm 4,0^A$

Letras minúsculas diferentes en la misma línea difieren: ^{a-b} P=0,0124; ^{b-c} P=0,0088; ^{b-d} P=0,0586; ^{f-h} P=0,0390; ^{h-i} P=0,0441; ^{h-j} P=0,0537. Letras mayúsculas diferentes en la misma línea difieren: ^{A-B} P=0,017; ^{B-C} P=0,0815; ^{C-D} P= P=0,0214; ^{C-E} P=0,0681; ^{E-F} P=0,0681; ^{F-G} P=0,0089; ^{G-H} P=0,0064; ^{G-H} P=0,0064; ^{H-J} P= 0,0051; ^{I-J} P=0,0279; ^{J-K} P=0,0024; ^{J-L} P=0,0127. SFB: suero fetal bovino. KSR: Knockout Serum Replacement. M: mórulas; BT: blastocistos tempranos; BR: blastocistos regulares; BEx: blastocistos expandidos; BE: blastocistos eclosionados. E. agrupados: embriones agrupados.

Se observó mayor número de blastocistos expandidos en el grupo KSR que en SFB y BSA, mientras que el número de blastocistos tempranos, regulares y eclosionados fueron estadísticamente similares entre grupos (Tabla 7). Cuando

se agruparon las mórulas y blastocistos tempranos se observó que los grupos de embriones suplementados con SFB o KSR produjeron menos embriones en estadios tempranos de desarrollo que el grupo BSA. Aunque los grupos SFB y KSR produjeron más embriones en estadios avanzados de desarrollo (blastocistos expandidos y eclosionados) la diferencia entre ellos no fue significativa (Tabla 7).

Los porcentajes de clivaje y de embriones totales no difirió entre grupos (Tabla 7). Se produjo un mayor porcentaje de blastocistos en los grupos SFB y KSR que en el grupo BSA. Los grupos SFB y KSR produjeron menor porcentaje de embriones en estadios tempranos de desarrollo (mórulas y blastocistos tempranos) que el grupo BSA. Cuando se adicionó SFB al medio de cultivo se obtuvo un porcentaje mayor de blastocistos regulares que cuando se adicionó KSR o BSA. Aunque el grupo KSR produjo mayor porcentaje de embriones en estadios avanzados de desarrollo (blastocistos expandidos y eclosionados) que los grupos SFB y BSA, la diferencia no fue significativa (Tabla 7).

Los embriones sujetos a doble tinción fluorescente tuvieron similar número total de blastómeras en los tres grupos experimentales (Tabla 8). Los embriones suplementados con KSR tuvieron un número menor de blastómeras alteradas que los suplementados con SFB o BSA. No obstante, el porcentaje de células alteradas fue significativamente diferente únicamente entre KSR y SFB (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del Knockout Serum Replacement o del suero fetal bovino sobre el número de blastómeras totales y el número y porcentaje de blastómeras alteradas en embriones congelados - descongelados.

Estructuras	Tratamientos (promedio ± error estándar)		
	BSA	SFB	KSR
Blastocistos (n)	19	18	20
Células totales	93,7 ± 4,1 ^a	91,9 ± 4,2 ^a	94,8 ± 4,0 ^a
Células alteradas			
número	10,1 ± 1,0 ^{a, b}	10,2 ± 1,0 ^b	7,3 ± 1,1 ^c
porcentaje	10,6 ± 1,0 ^{c, d, e}	11,4 ± 1,0 ^d	8,0 ± 1,1 ^e

Valores con letra diferente en la misma línea difieren: ^{a-b} P=0,0542; ^{a-c} P=0,0481; ^{d-e} P=0,0421. BSA: suplementados con albúmina sérica bovina. SFB: suero fetal bovino. KSR: Knockout Serum Replacement.

En general, luego de la descongelación, los blastocistos del grupo BSA tuvieron una tasa de reexpansión superior que los del grupo SFB seguido de los suplementados con KSR (Tabla 9). A las 4 y 24 horas de incubación, un porcentaje similar de blastocistos de los grupos BSA y SFB eclosionaron en una proporción significativamente mayor que los del grupo KSR. A las 48 horas, la tasa de eclosión fue superior en el grupo BSA seguido de SFB y, sin diferencias estadísticas entre los dos últimos. A las 72 horas de incubación, una proporción significativamente mayor de blastocistos del grupo BSA habían eclosionado en comparación con los grupos SFB y KSR, que no difirieron estadísticamente entre sí.

Tabla 98. Efecto del Knockout Serum Replacement o del suero fetal bovino sobre la reexpansión y eclosión de blastocistos a las 4, 24, 48 y 72 horas luego de la descongelación.

Estructuras	Tratamientos (promedio ± error estándar)					
	BSA		SFB		KSR	
	n	%	n	%	n	%

Blastocistos	50	43	59
Reexpansión			
4 h	36	74,8 ± 5,5 ^a	19
24 h	39	81,5 ± 7,0 ^{c, d}	28
48 h	37	77,1 ± 7,1 ^e	25
72 h	38	77,8 ± 8,3 ^g	23
Eclosión			
4 h	5	10,7 ± 3,9 ^a	4
24 h	17	35,8 ± 5,9 ^{j, k}	13
48 h	19	44,4 ± 7,3 ^{l, m}	11
72 h	30	58,9 ± 6,8 ⁿ	14

Valores con letra diferente en la misma línea difieren: ^{a-b} P=0,0133; ^{a-c} P=0,0004; ^{c-d} P=0,0301; ^{e-f} **P=0,0754**; ^{e-g} P=0,0024; ^{g-j} **P=0,0629**; ^{j-l} P=0,0415; ^{k-l} P=0,0063; ^{l-n} P=0,0137; ^{n-o} P=0,0331; ^{n-p} P=0,0018, SFB: suero fetal bovino, KSR: Knockout Serum Replacement.

CAPITULO V

5. DISCUSIÓN

Se encontró que los tres grupos experimentales tuvieron igual tasa de clivaje, lo cual concuerda con hallazgos previos en los que se compararon grupos de

embriones cultivados con y sin SFB (Rizos et al., 2003; Gómez et al., 2008; Amaral et al., 2022), aunque los porcentajes en algunos de esos estudios fueron mayores que los observados en esta investigación. Es lógico que la tasa de clivaje no haya variado entre tratamientos dado que la influencia de los suplementos comenzó una vez iniciado el cultivo, cuando la fecundación de los ovocitos ya había ocurrido.

Uno de los hallazgos de este estudio fue que, en general, aunque se produjo igual proporción de embriones totales entre los grupos experimentales, el porcentaje de blastocistos en el día 7 post-FIV fue significativamente superior en los suplementados con KSR y SFB. Además, en estos dos grupos hubo una proporción significativamente menor de mórulas y blastocistos tempranos. Esto denota que estos compuestos estimularon el desarrollo embrionario, en relación a los embriones suplementados con BSA. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Moore et al. (2007), quienes encontraron un efecto similar con la suplementación de SFB o KSR en el medio de cultivo (Moore et al., 2007). Amaral et al. (2022) observaron que ambos suplementos incrementaron la producción de blastocistos, con diferencia significativa con respecto al control (BSA) sólo en el día 6 post-FIV.

Previamente se reportó que la adición de SFB al medio de cultivo incrementó el porcentaje de blastocistos en el día 7 post-FIV en comparación con la adición de BSA (Thompson et al. 1998; Moore et al., 2007; Gómez et al., 2008; Sudano et al., 2011), aunque algunos estudios no encontraron diferencias al respecto (Rizos et al., 2003; Muci et al., 2003b; Amaral et al., 2022). El SFB contiene numerosas sustancias que pudieran haber estimulado mayor desarrollo de los blastocistos suplementados con este compuesto, entre ellas están las proteínas, aminoácidos,

vitaminas, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas (Muci et al, 2006a). Por ejemplo, el suero contiene factores embriotróficos como el factor de crecimiento fibroblástico o el factor de crecimiento similar a la insulina o el factor inhibidor de la leucemia, y la adición individual al medio de cultivo de estos tres factores de crecimiento incrementó la producción de blastocistos (Neira et al., 2010).

En el caso del KSR, las evidencias de su efecto sobre el desarrollo embrionario son escasas en bovinos. Hace varios años se demostró que la adición de 10% de KSR en el día 5 luego de la FIV incrementó la producción de blastocistos dos días más tarde (Moore et al., 2007). Poco después, se observó que la adición de 10% de KSR estimuló el desarrollo de blastocistos en igual proporción que el SFB o la BSA, pero en mayor proporción que el polivinil alcohol, la polivinilpirrolidona y el ficol (Mingoti et al., 2011). Un estudio publicado recientemente indicó que la suplementación del medio de cultivo con 3% de KSR fue tan efectivo como 3 % de SFB en la producción de blastocistos en el día 6 y 7 con respecto al control (BSA), aunque la diferencia fue significativamente sólo en día 6 (Amaral et al., 2022). En porcinos, la suplementación de 5% de KSR al medio de cultivo en el día 5 incrementó significativamente las tasas de supervivencia y eclosión de los blastocistos, así como también el número total de blastómeras en el día 7 luego de la FIV, en comparación con los cultivados sin KSR o con 10% de SFB (Sakurai et al., 2015).

El KSR, considerado un suplemento sintético, contiene aminoácidos, glucosa, insulina, transferrina, antioxidantes, sales inorgánicas, oligoelementos y una mezcla patentada de proteínas y vitaminas (Price, 1988), pero su composición química exacta se desconoce. Es factible que algunos de sus componentes, individualmente o combinados, hayan estimulado el desarrollo embrionario, tal

como se demuestra en este estudio y en los publicados en bovinos previamente (Moore et al., 2007; Amaral et al., 2022).

El propósito de esta investigación fue comprobar la efectividad del KSR en el desarrollo y la criotolerancia embrionaria, con el fin de tener una opción para sustituir al SFB como suplemento en el cultivo *in vitro* de embriones. Como es sabido, el SFB tiene sustancias desconocidas, en naturaleza y concentración, lo cual puede generar resultados variables y representar un riesgo debido a las numerosas alteraciones que ha causado su uso (Mucci et al., 2006b). Según lo planteado anteriormente, el SFB podría ser sustituido por el KSR en la producción de blastocitos para transferencia en fresco. Sin embargo, aunque en un estudio el KSR mostró mayor criotolerancia comparado con SFB y BSA (Moore et al., 2007), los embriones cultivados con este compuesto resultaron en menor proporción de preñeces (Amaral et al., 2022).

Luego de la evaluación post-descongelación de los blastocitos los resultados de este estudio fueron contradictorios. Por un lado, los embriones cultivados con KSR, que tuvieron similar número total de blastómeras que los otros dos grupos, presentaron menor número y porcentaje de células con la membrana celular alterada que los cultivados con SFB y BSA. Por otro lado, los embriones suplementados con KSR y SFB alcanzaron tasas de reexpansión y eclosión mucho más baja que con BSA, particularmente los del grupo KSR.

Estos últimos hallazgos contradicen lo señalado por Moore et al. (2007), quienes observaron una viabilidad a las 24, 48 y 72 horas post-descongelación significativamente mayor en los embriones cultivados con KSR que con SFB o BSA. No obstante, en otro estudio se comprobó que la transferencia de embriones cultivados con 3% de KSR resultó en menor proporción de preñeces comparado

con SFB o BSA. En este mismo estudio también se determinó que la mayor tasa de pérdidas embrionarias correspondió al grupo de receptoras transferidas con embriones producidos *in vitro* con KSR.

Debido al efecto adverso del SFB en la viabilidad post criopreservación de los embriones cuando se adiciona al medio de cultivo (Rizos et al., 2003; Muci et al., 2006b; Sudano et al., 2011), se planteó como objetivo de este estudio determinar si un producto químicamente definido como el KSR podía mejorar la criotolerancia embrionaria. Sin embargo, los resultados mostraron lo contrario.

Uno de los inconvenientes del SFB es que incrementa el contenido de lípidos citoplasmáticos (LC), y este evento está fuertemente asociado con la disminución de la criotolerancia embrionaria (Abe et al., 2002; Sudano et al., 2012). Asimismo, se demostró que la enzima diacilglicerol aciltransferasa-1 (DGAT1), que cataliza la etapa final de la síntesis de triglicéridos, es el principal componente de los LC en los embriones, y se identificó como responsable del incremento de los LC en embriones cultivados con 5% de SFB (Cañón-Beltrán et al., 2020). La inhibición de esta enzima redujo el contenido de LC de un modo dependiente de la dosis, y resultó en la producción de blastocistos con un número significativamente mayor de blastómeras, que los cultivados solo con 5% de SFB. Este conjunto de evidencias demuestra la inconveniencia de incluir al SFB en el medio de cultivo y, por tal motivo, se planteó probar un producto químicamente definido.

Aunque la menor sobrevivencia de los embriones cultivados con SFB es consistente con estudios previos (Rizos et al., 2003; Mucci et al., 2006b; Sudano et al., 2011), debido a que las lipoproteínas contenidas en el SFB son absorbidas y se acumulan en los embriones (Abe et al., 2002), la sobrevivencia alcanzada por los embriones producidos con KSR en este estudio no está claramente estudiada.

Por ser un producto químicamente definido se esperaba que KSR igualara o mejorara la crioresistencia embrionaria con respecto al SFB. En la patente del KSR se indica que uno de sus constituyentes es el producto Albumax I (Price et al., 1988), una albúmina rica en lípidos (Lim et al., 2008) que es producida por la empresa Gibco. Si la teoría indicada por Abe et al. (2002) es correcta, quizás el contenido lipídico de esta albúmina podría tener un efecto similar o más potente al que ejercen las lipoproteínas del SFB y, por ende, podría ser responsable de la menor viabilidad post-descongelación que se observó en este estudio, y que es consistente, además, con los hallazgos de preñez reportados por Amaral et al. (2022).

CAPITULO VI

6. CONCLUSIONES

Como resultado de esta investigación se concluye que:

1. Los embriones suplementados con KSR o SFB produjeron un mayor porcentaje de blastocistos totales y menor porcentaje de mórulas y blastocistos tempranos que los cultivados con BSA.
2. Luego de la congelación – descongelación, la adición de 5% de KSR o SFB fue perjudicial dado que redujo la viabilidad embrionaria post-criopreservación en comparación con los embriones suplementados con 0,6% de BSA.

CAPITULO VII

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda en futuras investigaciones evaluar la crio supervivencia de los embriones bovinos suplementados con KSR mediante la expresión de genes.
- Se recomienda el uso de la vitrificación de embriones bovinos como otro método de crio preservación y posteriormente la evaluación de la crio supervivencia embrionaria utilizando la misma metodología de la presente investigación.

CAPITULO VIII

8. REFERENCIAS

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 57-66.
- Álvares, P., De Dio, F., Zamparone, L., Rafagnin, L., Marcondes, M. (2016). In vitro production of bovine embryos. In: MM Seneda, KC Silva Santos, LS Rafagnin (Eds). *Biotechnology of Animal Reproduction*. Nova Science Publishers, Inc.
- Amaral, T. F., de Grazia, J. G. V., Martinhao, L. A. G., De Col, F., Siqueira, L. G. B., Viana, J. H. M., & Hansen, P. J. (2022). Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. *Scientific reports*, 12(1), 1-11.

- Aoshima K., Baba A, Makino Y., Okada, Y. (2013). Establishment of alternative culture method for spermatogonial stem cells using knockout serum replacement. *PLoS One*; 8, e77715.
- Baruselli PS, Catussi BLC, Abreu LA, Elliff FM, Silva LG, Baptista EOS. 2019. Challenges to increase the IA and ET markets in Brazil. *Animal Reproduction*, 16(3), 364-375.
- Block, J., Bonilla, L., Hansen, P.J. (2010). Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *Journal of Dairy Science*, 93, 5234-5242.
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2018). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 344-348.
- Brackett, B.G, Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 12, 260-274.
- Cañon-Beltran, K., Giraldo-Giraldo, J., Cajas, Y. N., Beltrán-Breña, P., Hidalgo, C. O., Vásquez, N., ... & Rizos, D. (2020). Inhibiting diacylglycerol acyltransferase-1 reduces lipid biosynthesis in bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 158, 267-276.
- Damiani, P., Fissore, R.A., Cibelli, J.B., Long, C.R., Balise, J.J., Robl, J.M., Duby, R.T. (1996). Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 45(4), 521-534.
- Dorland, M., Gardner, D.K., Trounson, A.O. (1994). Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 13, 70.
- Ferré L. (2017). Nuevas estrategias para mejorar la eficiencia del semen sexado en producción in vitro de embriones bovinos [Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral, Argentina]. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/1023>.

- Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Strøbech, L.B., Hyttel, P., Mermilliod, P., Ross P.J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5):836-848
- Gardner DK, M Lane. 1998. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction* 13,148-159.
- Gómez, E., Rodríguez, A., Muñoz, M., Caamaño, J. N., Hidalgo, C. O., Morán, E., ... & Díez, C. (2008). Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, 69(8), 1013-1021.
- Gordon I. (2003). In vitro fertilization. In Laboratory production of cattle embryos. Gordon, I (Ed), CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 176-219.
- Handrow, R.R., Lenz, R.W., & Ax, R.L. (1982). Structural comparisons among glycosamino-glycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(4), 1326-1332.
- Hansen, P. J. (2014). Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. In Current and future reproductive technologies and world food production (pp. 1-22). Springer, New York, NY.
- Hasler, J.F. (2010). Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 22, 119-125.
- Hawk, H.W., Wall, R.J. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes selection of oocyte and zygotes. *Theriogenology*, 41(8), 1571-1583.
- Hyttel P, Sinowitz F, Vejlsted M. (2010). Domestic Animal Embryology. London: Elsevier. pp 68-78.

International Embryo Technology Society (IETS). (2019). Embryo Technology Newsletter, 36(4):46.

https://www.iets.org/pdf/Newsletter/Dec19_IETS_Newsletter.pdf.

Kasinathan, P., Wei, H., Xiang, T., Molina, J. A., Metzger, J., Broek, D., ... & Allan, M. F. (2015). Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Scientific Reports*, 5(1), 1-4.

Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T., Niemann, H., Galli, C. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction* 67, 767–775.

Lim, K. T., Jang, G., Ko, K. H., Lee, W. W., Park, H. J., Kim, J. J., ... & Lee, B. C. (2008). Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Animal reproduction science*, 103(3-4), 239-248.

Lluisupa Landin, V. M. (2015). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos con la técnica de la vitrificación en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi (Bachelor's thesis, LATACUNGA/UTC/2015).

Lonergan, P., Rizos, D., Kanka, J., Nemcova, L., Mbaye, A. M., Kingston, M., ... & Boland, M. P. (2003). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 126(3), 337-346.

Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., Evans, A.C. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 7;65(1):137-152.

Lonergan, P., Fair, T. (2014). The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, 81: 49-55.

Manjunatha, B.M., Gupta, P.S., Ravindra, J.P., Devaraj, M., Nandi, S. (2008). In vitro embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification

of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Animal Reproduction Science*, 4(2-4), 419-426.

Mingoti, G.C., Castro, V.S.D., Méo, S.C., Barreto, L.S.S., Garcia, J.M. (2011). The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 47:361-367.

Moore, K., Rodriguez-Sallaberry, C. J., Kramer, J. M., Johnson, S., Wroclawska, E., Goicoa, S., & Niasari-Naslaji, A. (2007). In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*, 68(9), 1316-1325.

Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., Alberio, R.H. (2006a). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65, 1551-1562.

Mucci, N., Aller, J.F., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Alberio, R.H. (2006b). Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38, 97-104.

Nedambale, T.L., Du, F., Xu, J., Chaubal, S.A., Dinnyes, A., Groen, W., Faber, D., Dobrinsky, J.R., Yang, X., Tian, X.C. 2006. Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66, 1951-1960.

Neira, J. A., Tainturier, D., Pena, M. A., & Martal, J. (2010). Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 73(5), 595-604.

Palma, G. (2001). Producción in vitro de embriones. En: Biotecnología de la Reproducción. Palma G (Ed). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.

- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H., First, N.L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25, 591-600.
- Parrish, J.J., Krogenaes, A., Susko-Parrish, J.L. (1995). Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 44:859-856.
- Petkov SG, Anderson GB. (2008). Culture of porcine embryonic germ cells in serum-supplemented and serum-free conditions: The effects of serum and growth factors on primary and long-term culture. *Cloning Stem Cells*, 10:263-276.
- Pinyopummintra, T., Bavister B.D. (1991). In Vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction* 45, 736-742.
- Pinyopummintra, T., Bavister B.D. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41:1241-1249.
- Price, P.J., Goldsborough, M.D., Tilkins, M.L. (1998). Embryonic Stem Cell Serum Replacement (U.S. Patent No. WO 98/30679). World Intellectual Property Organization.
- Rieger, D. (1992). Relationship between energy metabolism and development of the early embryo. *Theriogenology*, 37, 75–93.
- Rienzi, L., Gracia, C., Maggiulli, R., LaBarbera, A. R., Kaser, D. J., Ubaldi, F. M., ... & Racowsky, C. (2017). Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human reproduction update*, 23(2), 139-155.
- Rios, G. L., Mucci, N. C., Kaiser, G. G., & Alberio, R. H. (2010). Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Animal reproduction science*, 118(1), 19-24.

- Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P., & Lonergan, P. (2001). Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, 56, 1-16.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., de la Fuente, J., Boland, M.P., Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68, 236-243.
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., de La Fuente, J., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 44-50.
- Sakurai, M., Suzuki, C., Yoshioka, K. (2015). Effect of knockout serum replacement supplementation to culture medium on porcine blastocyst development and piglet production. *Theriogenology*, 83(4), 679-686.
- Sanches, B.V., Zangirolamo, A.F., Seneda, M.M. (2019). Intensive use of IVF in large-scale dairy programs. *Animal Reproduction*, 16(3), 394-401.
- Sena-Netto, S. B., Sprícigo, J. F., Leme, L. O., Guimarães, A. L., Caixeta, F. M., Dode, M. A., & Pivato, I. (2020). The replacement of fetal bovine serum with bovine serum albumin during oocyte maturation and embryo culture does not improve blastocyst quality after slow freezing cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, 18(3), 171-179.
- Silva, M. E., & Berland, M. A. (2004). Vitrificación de blastocitos bovinos producidos in vitro con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36(1), 79-85.
- 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, 1211–1220.

- Sudano, M., Paschoal, M., Rascado, T., Crocomo, F.L., Oña, L., Junior, M., Machado, R., Landim-Alvarenga, F. da C. (2012). Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote* 22, 1-8.
- Thompson, J.G., Allen, N.W., McGowan, L.T., Bell, A.C.S., Lambert, M.G., Tervit, H.R. (1998). Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology*, 49, 1239-1249.
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Svenningsen, Å. F., Honegger, P., Knudsen, L. E., ... & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro*, 24(4), 1053-1063.
- Van Langendonckt, A., Donnay, I., Schuurbiers, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A., Dassy, F. (1997). Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109, 87-93.
- Viana J.H.M., Figueiredo A.C.S, Gonçalves R.L.R.; Siquiera L.G.B. (2018). A historical perspective of embryo-related technologies in South America. *Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium*. Foz do Iguaçu, PR, Brazil, September 16th to 20th, 2018.
- Xiang C, Jia, B.Y., Quan, G.B., Zhan, B., Shao, Q.Y., Zhao, Z.Y., Hong, Q.H., Wu, G.Q. (2019). Effect of knockout serum replacement during postwarming recovery culture on the development and quality of vitrified parthenogenetic porcine blastocysts. *Biopreserv Biobank*, 17(4), 342-351.

CAPITULO IX

9. ANEXOS



Anexo 1.- Acondicionamiento de ovarios, recorte de tejido adyacente



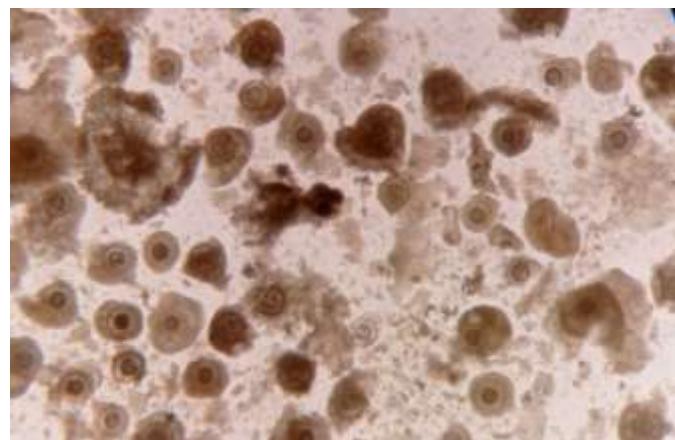
Anexo 2.- Aspiración de folículos ováricos



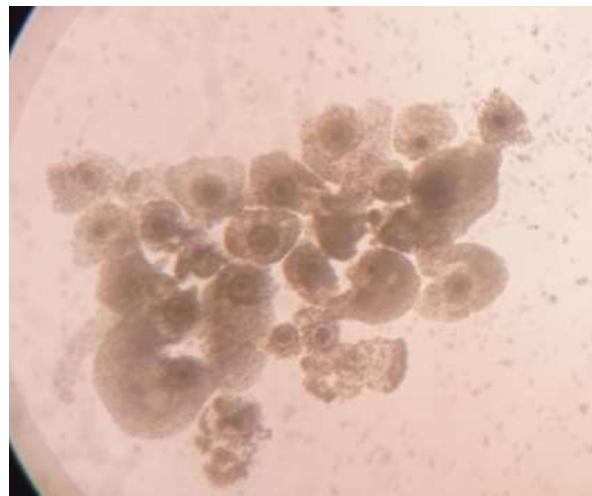
Anexo 3.- Recuperación de complejos cúmulos ovocitos



Anexo 4.- Búsqueda y clasificación de ovocitos



Anexo 5.- Selección de ovocitos



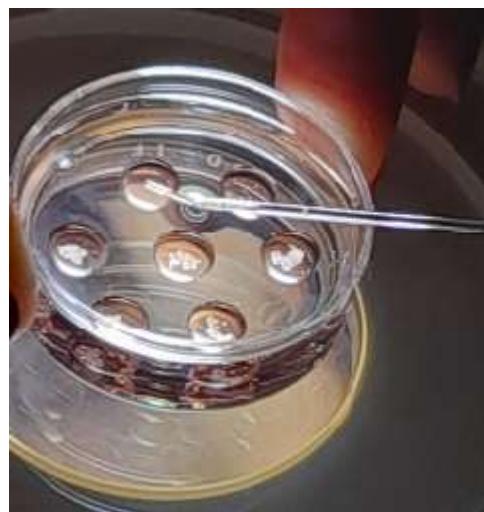
Anexo 6.- Maduración de ovocitos



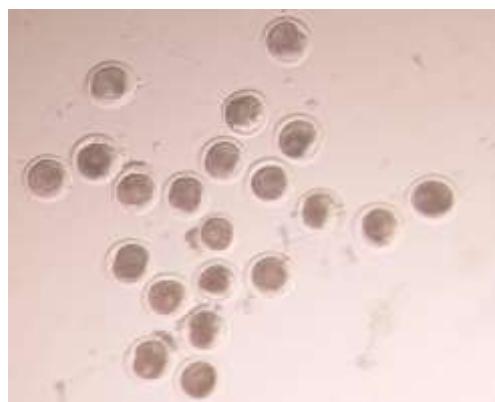
Anexo 7.- Selección espermática con columnas de percol



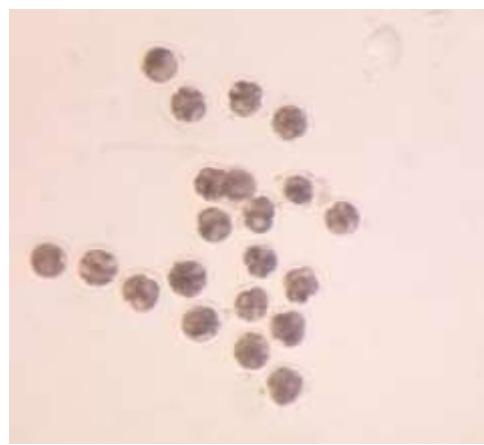
Anexo 8.- Determinación de la concentración espermática



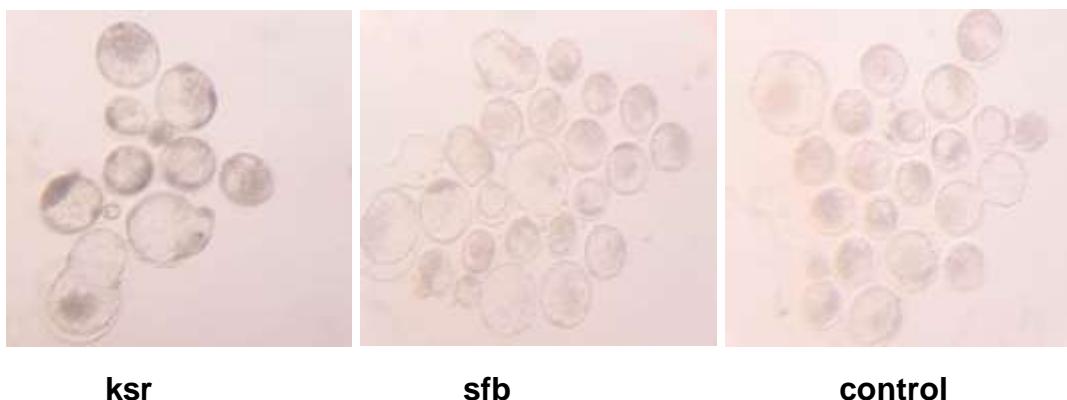
Anexo 9.- Inseminación artificial de ovocitos



Anexo 10.- Desempaque de ovocitos



Anexo 11.- Determinación del clivaje a las 72 horas de cultivo



Anexo 12.- cuantificación de embriones de acuerdo al tipo de tratamiento



Anexo 13.- Empajuelado de embriones con medio de congelación



Anexo 14.- Congelacion de embriones en etilenglicol



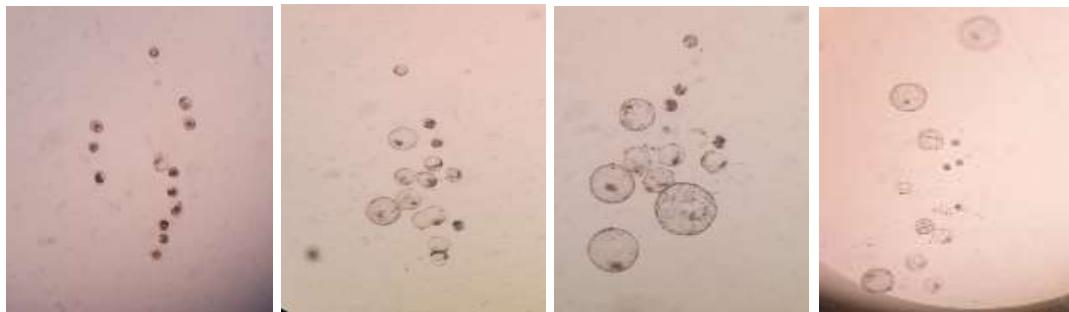
Anexo 15.- Descongelación de embriones



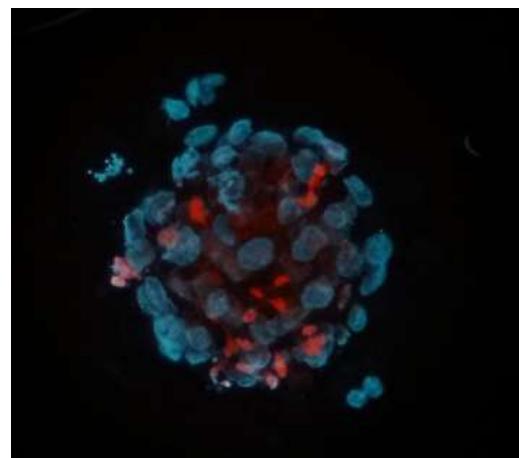
Anexo 16.- Evaluacion de la reexpansión y eclocción 4 – 24 – 48 - 72 horas KSR



Anexo 17.- Evaluacion de la reexpansión y eclocción 4 – 24 – 48 - 72 horas SFB



Anexo 18.- Evaluacion de la reexpansion y eclosion 4 – 24 – 48 - 72 horas
CONTROL



Anexo 19.- Tincion embrionario diferencial hoechst y ioduro de propido para conteo de celulas totales y alteradas