

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**



**CALIDAD POST VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES OVINOS ORIGINADOS DE
OVOCITOS TRATADOS CON RESVERATROL**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTADO POR:

**MVZ. ANDREA CAROLINA GONZÁLEZ GARZÓN
MATRÍCULA: 2203801569
EMAIL: andrea.gonzalez.garzon@unillanos.edu.co**

CO – DIRECTORES:

**DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO
DR. JULIO PORFIRIO RAMÓN UGALDE**

JURADO:

**PRESIDENTE: DR. DEMETRIO ALONSO AMBRÍZ GARCÍA
SECRETARIO: DR. JOSÉ ERNESTO HERNÁNDEZ PICHARDO
VOCAL: DR. CÉSAR CORTÉZ ROMERO
VOCAL: DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS**

IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO A 6 DE JULIO, 2023

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 6 de Julio de 2023

Comisión Académica del Posgrado

Presente

El(La) que suscribe Andrea Carolina González Garzón alumno(a) con número de matrícula 2203801569 del posgrado MBRA de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación 'Calidad post vitrificación de embriones ovinos originados de ovocitos tratados con resveratrol' a desarrollar en UAM - Iztapalapa. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Andrea Carolina González Garzón

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe **Andrea Carolina González Garzón** alumna de la **Maestría en Biología de la Reproducción Animal**, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Itztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada '**Calidad post vitrificación de embriones ovinos originados de ovocitos tratados con resveratrol**'.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el h. jurado para la obtención del grado de maestría en biología de la reproducción animal es de mi autoría y original creación, producto de resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si esta no fuese mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 06 de Julio del 2023.

Atentamente



Andrea Carolina González Garzón

COMITÉ TUTORIAL

CO-DIRECTORES

Dra. María del Carmen Navarro Maldonado
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
carmennavarro2006@yahoo.com.mx

Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, Yucatán
julio.ramon@itconkal.edu.mx

ASESOR INTERNO

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
deme@xanum.uam.mx

MIEMBROS DE JURADO EXAMEN DE GRADO

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

fahielca@gmail.com

Dr. Cesar Cortez Romero

Doctor en Biología y Agronomía

Colegio de Posgraduados, Campus San Luis Potosí.

ccortez@colpos.mx

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

deme@xanum.uam.mx

Dr. José Ernesto Hernández Pichardo

Dr. Biología Experimental

Departamento de Producción Agrícola y Animal

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

ehernan@correo.xoc.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Al programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana perteneciente al programa nacional de posgrados de calidad (PNPC) y al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) por el apoyo proporcionado para realizar el presente trabajo a través de la beca número 1168492.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

El jurado designado por la comisión de la maestría en biología de reproducción animal de la división de ciencias biológicas y de la salud de la universidad autónoma metropolitana, unidad Iztapalapa, aprobó la tesis titulada 'Calidad post vitrificación de embriones ovinos originados de ovocitos tratados con resveratrol' con fecha 06 de Julio de 2023.



Presidente

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Departamento de Biología de la Reproducción Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad Iztapalapa



Secretario

Dr. José Ernesto Hernández Pichardo

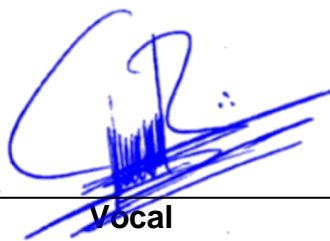
Departamento de Producción Agrícola y Animal Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad Xochimilco



Vocal

Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa



Vocal

Dr. Cesar Cortez Romero

Doctor en Biología y Agronomía
Colegio de Posgraduados, Campus San Luis Potosí

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, principalmente a mi padre Jair González, quien me ha enseñado que los grandes sacrificios en la vida tienen sus grandes recompensas, a mi madre Lighiola Garzón quién me ha enseñado que los sueños se persiguen y me ha impulsado a ser valiente y a mi hermano Santiago González quién es mi motor para demostrarle que los sueños se cumplen y que mis logros siempre serán para él, porque quiero que vuele lejos y logre todo lo que se proponga.

A mis abuelos (Alita Amparo, Abuelita Miriam y Abuelito Lucho), a mi tía favorita (Bby), demás tíos, mis primas, primos, etc., quienes siempre han celebrado mis triunfos y han dado palabras de aliento.

Agradezco a mis grandes amigas Enanis (compañera de mil batallas y sueños), Carito (mi sensei) y ahora Evaluna (la princesa de las Tree) por el apoyo permanente, por tantas alegrías. Gracias por ser mi sostén y por celebrar siempre mis triunfos. Ustedes son la prueba de que la verdadera amistad existe. Gracias mi gran BFF Adri porque desde niñas hemos estado unidas, por ser mi consejera de cabecera y alegrarte siempre por mis triunfos. Gracias a todos mis amigos (Dairini, Nata, Ange, Lina, etc.) quienes aún en la distancia celebran mis victorias, me apoyan, animan y son incondicionales.

Gracias destino porque durante mi estancia en México encontré el amor de mi vida... Gracias parce, gracias G, gracias mi bonis, gracias amor por cruzarte en mi camino, por ser paciente y brindarme tanta alegría. Te amis infinitamente.

A todas las personas en mí país que tenemos el sueño de continuar nuestros estudios y por limitantes especialmente económicos no lo hacemos. Persigan sus sueños, toquen puertas y verán que el que persevera alcanza.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias a Dios, por darme esta oportunidad, llenarme de sabiduría durante el camino, por levantarme, fortalecerme y protegerme siempre. Por siempre poner bendiciones en mi camino. En tus manos siempre mis pasos.

Agradezco a la UAM, Unidad Iztapalapa por brindarme la oportunidad de estudiar allí la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, lo cual ha sido muy enriquecedor y halagador para mí. Es un sueño cumplido.

Agradezco a los doctores (Dra. Carmen, Dr. Demetrio y Dr. Julio) porque a pesar de los obstáculos, pequeños fracasos y frustraciones me ayudaron a crecer como persona, profesionalmente, a reafirmar mis valores y educación. Gracias al Dr. Ernesto y Dr. Luis por el apoyo prestado durante mi escritura de tesis y en su laboratorio de UAM-X; también, a mis demás sinodales Dra. Fahiel y Dr. César por sus aportes y comentarios para que mi trabajo fuera impecable. Agradezco a todos mis mentores quienes me formaron académicamente (Dra. Marcela, Dr. Mendieta, Dr. Herrera, Dra. Leticia, Dra. Ángeles, Dra. Edith, entre otros.).

Durante el camino conocí y compartí con personas maravillosas a las cuales les agradezco con el alma lo que cada uno ha hecho por mí: Roberto, mi maestro, amigo y consejero fuiste clave para mi crecimiento y aprendizaje; Iván mi compa, desde el día cero de este gran reto nos ayudamos, apoyamos, dimos moral en los momentos difíciles y estuvimos riéndonos de nuestros logros y tropiezos y a esos parceros con quienes reí, lloré y conocí de la cultura de este gran país (Jaime, Dante, Adrián, y Rodri). Isa y Rebe mis amigas mexicanas, quienes sin conocerme me brindaron apoyo, abrieron las puertas de su hogar y me han regalado momentos maravillosos aquí. Los aprecio muchísimo.

Todo lo que desees, lo puedes!

ABREVIATURAS

μg Microgramos

μM Micromolar

AMPc Adenosín monofosfato Cíclico

APO Área Pre Óptica

ATP Adenosín - 5 - trifosfato

CC Células de Cúmulo

CDMX Ciudad de México

CE Cultivo celular

COC Complejo-*cumulus*-ovocito

COC'S Complejos-*cúmulus*-ovocitos

DIV Desarrollo *in vitro*

DMSO Dimetil Sulfóxido

EG Etilenglicol

EGF Factor de Crecimiento Epidérmico

ERK Quinasas Reguladoras de la Señal Extracelular

ERO Especies Reactivas de Oxígeno

FIV Fertilización *in vitro*

FSH Hormona Folículo Estimulante

GC Grupo Control

GE Grupo Experimental

GnRH Hormona Liberadora de Gonadotropinas

GSH Glutatión

GV Vesícula Germinal

h Hora

hCG Hormona Coriónica Humana

IA Inseminación Artificial
IETS Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones
LH Hormona Luteinizante
MDA Malondialdehido
mg Miligramos
MII Metafase II
min Minuto
MIV Maduración *in vitro*
mL Mililitros
mM Milimolar
MPF Factor Promotor de la Maduración
NO Óxido nítrico
P4 Progesterona
PEIV Producción de Embriones *in vitro*
PGF2 α Prostaglandina F2 α
PVA Alcohol Polivinílico
rpm Revoluciones por Minuto
SC Solución de Calentamiento
SFB Suero Fetal Bovino
SIRT1 Sirtuina 1
SSS Sustituto de Suero Sintético
TBARs Acido Tiobarbitúrico
TCM-199 Medio de Cultivo de Tejidos 199
ZP Zona Pelúcida
DPBS Solución salina amortiguada por fosfatos de Dulbecco

RESUMEN

En la producción de embriones *in vitro* de *O. aries* en las condiciones inherentes de las técnicas, así como de crioconservación ocasiona que estos sean susceptibles a desarrollar estrés oxidante. Dicho estrés es debido al exceso de producción de radicales libres frente a los reducidos antioxidantes endógenos, ocasionando con ello daños en los embriones hasta producirles procesos degenerativos y la muerte. El resveratrol es un polifenol natural presente en plantas como la vid (*Vitis vinifera*), y tiene actividad biológica para protegerlas del ataque de patógenos (por ejemplo, hongos y bacterias). El resveratrol tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios, cardioprotectores, anticancerígenos y regula la expresión génica relacionada con la apoptosis, activando la Sirtuina 1 (SIRT1), aumentando la función mitocondrial y el contenido de ATP en los ovocitos. Debido a sus propiedades antioxidantes se propuso durante la presente investigación comprobar su efecto a concentraciones de 0; 0.25; 0.5 y 1 μM , exclusivamente durante la MIV. También se evaluó la tasa de DIV, producción de blastocistos y supervivencia embrionaria post vitrificación en la producción de embriones de *O. aries*. El resveratrol utilizado durante la MIV ejerció un efecto positivo ($p < 0.05$) en la MIV (74% vs. 81%) y DIV (63% vs. 69%). En la producción de blastocistos no se evidenció diferencias estadísticas ($p > 0.05$). Para determinar el efecto antioxidante del resveratrol se cuantificó la cantidad de ERO embrionaria, siendo mayor su concentración en el grupo control (34,722) que en los grupos donde se aplicó resveratrol. Sin embargo, la presencia de GSH tuvo un efecto inversamente proporcional respecto a la presencia de ERO, siendo mayor a concentraciones de 0.5 (94,446) y 1 μM (74,759) de resveratrol. Este efecto es un hallazgo importante que demuestra el efecto antioxidante del resveratrol durante la producción de embriones de *O. aries* ya que, además, se evidenció una mayor tasa de supervivencia embrionaria post vitrificación, posiblemente debido a la disminución del estrés oxidante que se pudiera producir y el aumento de antioxidantes endógenos como el GSH.

ABSTRACT

In the production of *in vitro* embryos of *O. aries* under the inherent conditions of the techniques as well as cryopreservation causes them to be susceptible to developing oxidative stress. Said stress is due to the excess production of free radicals compared to the reduced endogenous antioxidants, thereby causing damage to the embryos until producing degenerative processes and death. Resveratrol is a natural polyphenol present in plants such as grapevines (*Vitis vinifera*) and has biological activity to protect them from attack by pathogens (for example fungi and bacteria). Resveratrol has antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective, anticancer effects and regulates gene expression related to apoptosis, activating Sirtuin 1 (SIRT1), increasing mitochondrial function and ATP content in oocytes. Due to its antioxidant properties, it was proposed during the present investigation to verify its effect at concentrations of 0; 0.25; 0.5 and 1 μM , exclusively during IVM. The IVD rate, blastocyst production and post-vitrification embryo survival in the production of *O. aries* embryos were also evaluated. Resveratrol used during IVM had a positive effect ($p < 0.05$) on IVM (74% vs. 81%) and IVD (63% vs. 69%). There were no statistical differences ($p > 0.05$) in the production of blastocysts. To determine the antioxidant effect of resveratrol, the amount of embryonic ROS was quantified, its concentration being higher in the control group (34,722) than in the groups where resveratrol was applied. However, the presence of GSH had an inversely proportional effect with respect to the presence of ROS, being higher at concentrations of 0.5 (94,446) and 1 μM (74,759) of resveratrol. This effect is an important finding that demonstrates the antioxidant effect of resveratrol during the production of *O. aries* embryos since, in addition, a higher post-vitrification embryo survival rate was evidenced, possibly due to the decrease in oxidative stress that could be produced and the increase of endogenous antioxidants such as GSH.

INDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
ÍNDICE DE FIGURAS E ILUSTRACIONES	XVII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. CICLO ESTRAL	3
2.2. ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA	4
2.3. PRODUCCIÓN <i>in vitro</i> DE EMBRIONES.....	5
2.3.1. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos (MIV).....	5
2.3.2. Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	8
2.3.3. Desarrollo <i>in vitro</i> (DIV).....	10
2.4. DESARROLLO EMBRIONARIO	10
2.5. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES PRODUCIDOS <i>in vitro</i>	12
2.6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) Y ESTRÉS OXIDANTE	13
2.7. BIOSÍNTESIS DEL RESVERATROL	14
2.7.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	16
2.7.2. GLUTATIÓN (GSH)	16
3. ANTECEDENTES.....	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	20
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
6. HIPÓTESIS.....	20
7. OBJETIVOS.....	21
7.1. GENERAL.....	21
7.2. ESPECÍFICOS	21
8. DISEÑO EXPERIMENTAL	22
9. METODOLOGÍA	23
9.1. COLECTA DE OVOCITOS	23
9.2. MADURACIÓN <i>in vitro</i> (MIV) DE OVOCITOS DE <i>O. aries</i>	23

9.3. FERTILIZACIÓN <i>in vitro</i> (FIV) y DESARROLLO <i>in vitro</i> (DIV) DE EMBRIONES DE <i>O. aries</i>	25
9.4. VITRIFICACIÓN Y POST VITRIFICACIÓN.....	26
9.4.1. VITRIFICACIÓN.....	26
9.4.2. DESVITRIFICACIÓN	27
9.5. NIVELES DE ERO EN EMBRIONES DESVITRIFICADOS	27
9.6. NIVELES DE GLUTATION (GSH) EN EMBRIONES DESVITRIFICADOS.	28
9.7. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA	28
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
11. RESULTADOS	29
11.1. COLECTA DE OVOCITOS	29
11.2. MADURACIÓN <i>in vitro</i> (MIV) DE OVOCITOS, TASAS DE SEGMENTACIÓN EMBRIONARIA Y DE DESARROLLO A BLASTOCISTOS, EN <i>O. aries</i>	29
11.3. VITRIFICACIÓN Y POST VITRIFICACIÓN.....	30
11.4. NIVELES DE ERO Y GSH EN EMBRIONES POST VITRIFICACIÓN	30
11.5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA NO VITRIFICADOS Y POST VITRIFICACIÓN	31
12. DISCUSIÓN	33
12.1. Efecto del resveratrol en la MIV	33
12.2. Efecto del resveratrol en el DIV y tasa de blastocistos	34
12.3. Efecto del resveratrol en la presencia de ERO	35
12.4. Efecto del resveratrol en el estrés oxidante	36
12.5. Efecto del resveratrol en la crioconservación de embriones producidos <i>in vitro</i>	36
12.6. Efecto del resveratrol en la calidad de embriones producidos <i>in vitro</i>	37
13. CONCLUSIONES.....	38
14. BIBLIOGRAFÍA	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tasa de MIV, DIV y de blastocistos de <i>O. aries</i> a partir de ovocitos tratados con resveratrol (Porcentaje \pm EE).	29
Tabla 2. Tasa de blastocistos a 48 h post vitrificación producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.	30
Tabla 3. Niveles de ERO y GSH (unidades de intensidad de fluorescencia) en blastocistos a 48 h post vitrificación, producidos a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.	31
Tabla 4. Número de núcleos presentes en blastocistos de <i>O. aries</i> producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.	32
Tabla 5. Número de núcleos presentes en blastocistos de <i>O. aries</i> , producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.	32

ÍNDICE DE FIGURAS E ILUSTRACIONES

Figura 1. Representación esquemática del desarrollo folicular y de los perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. Fuente: Simonetti, 2017.....	3
Figura 2. Influencia del fotoperiodo y eventos hormonales del ciclo estral en la oveja. Tomado de Agustín, 2012.	5
Figura 3. Grados de clasificación de ovocitos según su morfología. Fuente: Modificado de Rodríguez (2013).	8
Figura 4. Esquema de la cronología del desarrollo embrionario en la oveja (días post celo).....	11
Figura 5. Biosíntesis del resveratrol. Tomado de Gambini <i>et al.</i> , 2013.	15
Figura 6. Mecanismo citotóxico del resveratrol. Tomado de Palacios, 2014.	15
Figura 7. Mecanismo de la actividad antioxidante del resveratrol. Tomado de Hussein, 2017.	16
Figura 8. Biosíntesis del Glutathion (GSH). Tomado de Martínez <i>et al.</i> , 2016.	17
Figura 9. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos de <i>O. aries</i>	24
Figura 10. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones obtenidos por FIV a partir de ovocitos aspirados de <i>Ovis aries</i> post mortem.	26
Figura 11. Blastocistos a 48 h post vitrificación producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol.....	30
Figura 12. Presencia de ERO (verde) y GSH (azul) en blastocistos a 48 h post vitrificación, producidos a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.	31
Figura 13. Presencia de núcleos en blastocistos de <i>O. aries</i> previo a la vitrificación, producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV ..	32
Figura 14. Número de núcleos presentes (tinción DAPI) en blastocistos de <i>O. aries</i> , producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV. Sin vitrificar (azul) y post vitrificación (gris). Literales diferentes muestran diferencias significativas a $p \leq 0.05$	32

1. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones es una biotecnología reproductiva que impacta los sistemas ganaderos, favoreciendo el mejoramiento genético y como modelo de investigación del desarrollo embrionario. Actualmente, su aplicación en ovinos y bovinos se ha intensificado y se trabaja en los procesos de su estandarización en otras especies. A partir de ella se dio el desarrollo de nuevas biotecnologías como la clonación de embriones y la transgénesis. Gracias a estos avances, surge la necesidad de la conservación de los embriones producidos, a partir de técnicas de crioconservación, las cuales igualmente han sido un campo ampliamente desarrollado a nivel mundial en los últimos años (Parra *et al.*, 2021; Torres y Moreno, 2021).

Sin embargo, los medios y procesos utilizados para la crioconservación y la producción *in vitro* de embriones pueden generar daños a éstos, disminuyendo así la viabilidad. Es por esto por lo que, en la actualidad, se busca hacer más eficientes este tipo de biotecnologías a través de la investigación, partiendo desde la evidencia científica de los principales factores que ejercen este daño celular, como lo es el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Torres *et al.*, 2019).

El resveratrol (3,4', 5-trihidroxiestilbeno), es un polifenol natural presente en plantas como la vid (*Vitis vinifera*), y tiene actividad biológica para protegerla del ataque de patógenos (por ejemplo hongos y bacterias). Su síntesis está condicionada por la presencia de factores estresantes, tales como la contaminación fúngica o la radiación ultravioleta. En las plantas actúa como fitoalexina, es decir que posee la capacidad de inhibir el progreso de ciertas infecciones. El resveratrol tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios, cardioprotectores y anticancerígenos (Gambini *et al.*, 2013), y regula la expresión génica relacionada con la apoptosis, activando la Sirtuina 1 (SIRT1), aumentando la función mitocondrial y el contenido de ATP en los ovocitos (Itami *et al.*, 2015).

El resveratrol ha sido utilizado en técnicas reproductivas *in vitro*. Martínez *et al.* (2019), observaron que a concentraciones de 0.25 y 0.5 μM durante la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos mejoró su calidad y promovió la compactación de las mórulas producidas por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) en ovino (*O. aries*). Otros autores reportaron el uso del resveratrol durante la MIV, debido a que redujo significativamente los niveles de las ERO intracelulares y aumentó las concentraciones de enzimas antioxidantes como el glutatión (GSH). Incluso mejoró

el rendimiento en la producción de blastocistos, concluyendo que su uso provocó un microambiente benéfico dentro de los ovocitos, al aumentar la GSH intracelular y disminuir el nivel de ERO. Esto estimuló el desarrollo embrionario y la expresión génica regulada (Mukherjee *et al.*, 2014).

Por otro lado, datos de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), demuestran que los ovinos son la tercera especie con mayor producción de embriones a nivel mundial, después de los bovinos y los equinos. En el 2018 se produjeron 18.400 embriones ovinos, convirtiéndose Sudamérica en el mayor productor y concretamente Brasil en el país con mayor producción. Con respecto a las exportaciones de embriones de ovino, éstas aumentaron un 34.3%, lideradas por Canadá, seguido de Australia. Cabe señalar que todos los embriones exportados fueron producidos *in vivo* (Viana, 2019).

Para el año 2016, Colombia ocupó el octavo lugar en cuanto a producción de carne ovina con 7.503 toneladas, en tanto que Brasil (91.000 toneladas), México (60.000 toneladas) y Argentina (52.000 toneladas) ocuparon los primeros lugares. Respecto a la producción de carne caprina, Colombia ocupó el quinto lugar con una producción de 6.564 toneladas, México ocupó el primer lugar (39.531 toneladas), seguido de Brasil (31.350 toneladas) y Argentina (11.211 toneladas) (FAO, 2019).

Ante esta producción de embriones y demanda internacional se hace necesaria la preservación del material genético a través de la crioconservación de embriones provenientes de animales productivos de interés económico, para optimizar los procesos de la transferencia de embriones, ya que permite aumentar las tasas de supervivencia embrionaria. Esto la convierte en una herramienta útil para el mejoramiento genético en los sistemas de producción ganaderos de México y Sudamérica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. CICLO ESTRAL

Las borregas son poliéstricas estacionales, su ciclo estral tiene una duración aproximada de 17 días. En la fase lútea, que comprende el metaestro y diestro, la concentración de progesterona alcanza valores de 1 ng/mL^{-1} , esta hormona se sintetiza y libera a partir de un cuerpo lúteo maduro y funcional. La progesterona ejerce un efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotalámico e inhibe la secreción pulsátil de GnRH y, por lo tanto, de LH. De manera específica, la progesterona actúa a nivel del área preóptica (APO), en donde activa las neuronas GABA e induce la síntesis de este neurotransmisor, el cual actúa en las neuronas productoras de GnRH e inhibe la síntesis de esta hormona (Evans *et al.*, 2002; Jackson y Kuehl, 2002). En este evento, se sugiere también la participación de los péptidos opioides endógenos, neurotransmisores que se sintetizan principalmente en el núcleo hipotalámico y en condiciones fisiológicas específicas (principalmente durante el anestro posparto), inhiben la frecuencia de pulsos de GnRH/LH (Arroyo *et al.*, 2009).

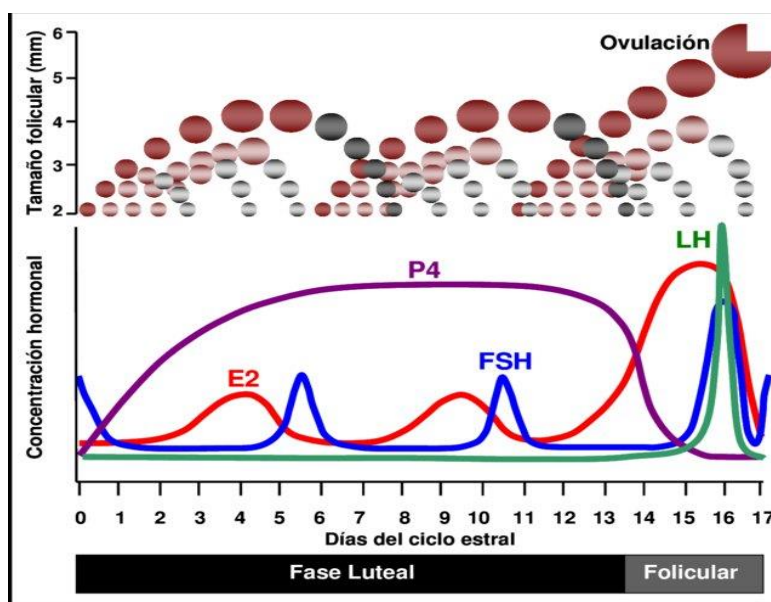


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo folicular y de los perfiles hormonales durante el ciclo estral de la oveja. Fuente: Simonetti, 2017.

Durante la fase folicular (proestro y estro), la concentración de progesterona (P4) es basal, como consecuencia de la lisis del cuerpo lúteo inducida por la $\text{PGF2}\alpha$, los folículos ováricos crecen y maduran hasta alcanzar un estado preovulatorio. La síntesis de estradiol en las células de la granulosa aumenta progresivamente, lo

cual induce el aumento de esta hormona esteroide en la circulación periférica y actúa de manera directa en las neuronas GnRH a nivel del núcleo ventromedial, el cual se localiza en el área hipotalámica mediobasal, induciendo el pico preovulatorio de GnRH/LH y 24 h después, la ovulación (Figura 1). En esta etapa fisiológica, el estradiol ejerce un efecto de retroalimentación positiva (Bartlewski *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2000).

2.2. ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA

La estacionalidad reproductiva forma parte del proceso de selección natural. Es un mecanismo de adaptación desarrollado por algunos mamíferos silvestres, entre ellos los ovinos, como estrategia para minimizar el impacto negativo del ambiente (temperatura, humedad y disponibilidad de alimento) en la supervivencia de las crías. De manera que los nacimientos ocurren en la época más favorable del año, con abundancia de pastos y temperatura ambiental confortable lo que impacta en el bienestar de las crías. Los ovinos presentan anualmente dos etapas reproductivas: una fase de anestro estacional (días largos - 16 h luz por 8 h de oscuridad), en el que en las hembras los ciclos estrales regulares están ausentes (Barrell *et al.*, 1992), cesan la receptividad sexual y la ovulación.

El fotoperiodo es el factor ambiental primario que regula estos eventos. Las especies estacionales poseen un sistema neurofisiológico capaz de transformar la señal luminosa en una señal hormonal a través de la síntesis de melatonina y de esta manera detectar las variaciones anuales en la duración del fotoperiodo (Malpaux *et al.*, 2002). En este mecanismo, la luz es captada en el ojo, a través de la retina, la señal luminosa se transforma en una señal eléctrica que es conducida de la retina al hipotálamo por medio del tracto retinohipotalámico. En el hipotálamo, el núcleo supraquiasmático capta la señal y posteriormente la transfiere al núcleo paraventricular y éste finalmente al cerebro posterior, específicamente al ganglio cervical superior (Figura 2). En este punto, la señal eléctrica se transforma en una señal química. El ganglio cervical superior libera noradrenalina, la cual es captada por receptores α y β adrenérgicos en la membrana celular de los pinealocitos, induciendo la síntesis de la N-acetiltransferasa, enzima fundamental en la síntesis de melatonina (Arendt, 1998). De esta manera, la hormona se sintetiza en los pinealocitos de la glándula pineal durante las horas de oscuridad a partir del aminoácido triptófano (Rosa y Bryant, 2003). La menor duración en la secreción de melatonina durante los días largos permite la síntesis de dopamina la cual induce el anestro estacional. Durante los días cortos, la mayor duración en la síntesis y secreción de melatonina inhibe la producción de dopamina, con el subsecuente restablecimiento de la actividad estral y la ovulación (Malpaux *et al.*, 2002).

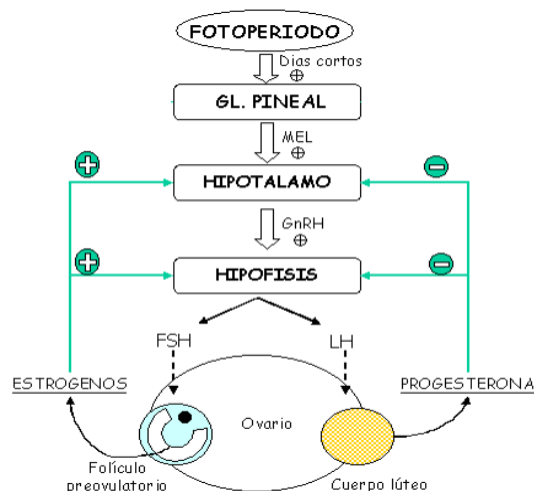


Figura 2. Influencia del fotoperiodo y eventos hormonales del ciclo estral en la oveja. Tomado de Agustín, 2012.

2.3. PRODUCCIÓN *in vitro* DE EMBRIONES

El proceso de producción de embriones por fertilización *in vitro* (FIV), puede dividirse en tres pasos fundamentales: 1) Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), 2) Fertilización *in vitro* (FIV) y 3) Desarrollo *in vitro* de embriones (DIV). Estos tres pasos comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos, condicionando cada uno al éxito o al fracaso del siguiente.

2.3.1. Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)

La MIV de ovocitos, comprende dos procesos: Primero, la maduración nuclear, que involucra la condensación del material nuclear seguido de la formación de los cromosomas. Segundo, la maduración del citoplasma que comprende la redistribución de los organelos y la maduración. La maduración anormal del citoplasma en ovocitos puede asociarse con un porcentaje reducido de obtención de blastocistos tras la fecundación, aun cuando la maduración nuclear ocurra (O'Brien *et al.*, 1996).

La maduración citoplasmática, corresponde a los cambios que acontecen en el paso de ovocito primordial hasta el de embrión transcripcionalmente activo y se puede dividir en:

- Capacitación ovocitaria, que es el proceso en que se prepara al ovocito durante la foliculogénesis para el desarrollo embrionario posterior (Tarazona *et al.*, 2010). En

este periodo sólo se dividen las células del folículo ovárico, no el ovocito. Representa un período de síntesis intensa y almacenamiento de macromoléculas.

- Modificaciones bioquímicas y morfológicas del ovocito durante la maduración desencadenadas por el pico de LH. La maduración ovocitaria está desencadenada por la respuesta folicular al pico preovulatorio de gonadotropinas, que confiere al ovocito la capacidad de sostener la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Durante la maduración, las células de la granulosa siguen produciendo esteroides, pero tiene lugar el paso de un ambiente estrogénico a otro donde predomina la progesterona. Por otra parte, producen ácido hialurónico que permite la expansión y mucificación de las células del cúmulo y la pérdida de las uniones tipo "GAP" de contacto entre el ovocito y estas células. El potencial para la maduración nuclear y citoplasmática se adquiere conjuntamente durante el desarrollo del ovocito (Picton *et al.*, 1998).

En la maduración nuclear, los ovocitos de la mayoría de los mamíferos se encuentran detenidos en la etapa de diploteno de la profase I de la primera división meiótica, hasta que se produce la adecuada estimulación de factores de crecimiento y hormonales, que da lugar a la progresión a la etapa de Metafase II (MII). Posteriormente, éstos quedarán dictiados en este estadio de MII hasta que se produzca la fecundación (Cuadrado, 2012).

La adquisición de la competencia meiótica está asociada a la aparición de componentes esenciales del ciclo celular, como el factor promotor de la maduración, quinasa que se activa en los ovocitos completamente desarrollados entre las 8 y 12 h después de la inducción de la maduración (Cuadrado, 2012).

La reanudación de la meiosis se da por diversas moléculas que regulan el proceso meiótico, tales como: Adenosínmonofosfato cíclico (AMPc), factores promotores de la maduración (MPF) y quinasas reguladoras de la señal extracelular (ERK) (Cuadrado, 2012).

La maduración meiótica del ovocito conlleva la capacidad para el rompimiento de la membrana nuclear y la posterior progresión hasta MII. Resumiendo, la reanudación de la meiosis puede explicarse mediante una reducción en la concentración de AMPc y la consiguiente activación-inactivación de proteínas presentes en el ooplasma (Picton *et al.*, 1998). Durante esta fase se pasa de la presencia de cromatina dispersa en un primer momento, a diferentes estadios de condensación de ésta, hasta formar una red de bivalentes individuales, la desaparición del nucléolo y la ruptura de la vesícula germinal (GV) (Cuadrado, 2012).

Para lograr la MIV del ovocito (MII), el tiempo de cultivo necesario cercano al requerido *in vivo*. Para los ovocitos ovinos corresponde entre 24 y 27 h. Recientemente, otros autores apuntan a la necesidad de reducir los tiempos de maduración para conseguir una mejor calidad ovocitaria, ya que se ha observado que los ovocitos más viejos tienen menor capacidad de ser fecundados que los jóvenes, debido a la menor cantidad de quinasa H1 y a la menor cantidad de la forma activada del MPF (Cuadrado, 2012).

Las condiciones físicas específicas del ambiente en el que maduran los ovocitos (osmolaridad, pH y composición iónica del medio, temperatura y tensión de CO₂ y O₂ de la incubadora, volumen de cultivo y tiempo de incubación), así como la mayor o menor definición del medio de maduración utilizado (suero, células somáticas, etc.) van a influir en el resultado final (Holm y Callesen, 1998). La temperatura de incubación más utilizada, tanto en la MIV como en la FIV y el cultivo de embriones (CE), se encuentra cercana a la temperatura corporal de la oveja que es de 38.5 °C. La atmósfera de cultivo empleada como rutina en los protocolos de producción de embriones ovinos es de 5% de CO₂ (Martínez, 2019).

Luego de la MIV, aproximadamente el 90% de los ovocitos puestos a cultivar alcanzan la MII y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 h de comenzada la MIV. Es importante que, una vez que el ovocito esté en esa etapa, se establezca su calidad morfológica (Figura 3). De forma general, se considera un ovocito maduro (complejo cúmulo ovocito - COC) de buena calidad, a aquel que presenta una forma esférica, con una zona pelúcida (ZP) regular, un corpúsculo polar intacto, con un citoplasma homogéneo y sin inclusiones. Así mismo, presentará una buena expansión de las células del cúmulo y células de la corona radiada. De acuerdo con estas características los ovocitos se clasifican por su calidad (ASEBIR, 2015) en:

Grado A o excelentes: COC con citoplasma granular homogéneo, y con 4 o más capas de células del cúmulo.

Grado B o buenos: COC con citoplasma granular homogéneo y con 2-3 capas de células del cúmulo.

Grado C o regulares-malos: ovocitos parcial o totalmente denudados o con las células del cúmulo expandidas y con el citoplasma no homogéneo y oscurecido.

Grado D o mala calidad: ovocito totalmente denudado, citoplasma irregular, con pigmentación aumentada y vacuolas.

Grado E o maduros: son ovocitos de buena calidad con cumulo ya expandido, por lo tanto, descartados para el proceso de MIV.

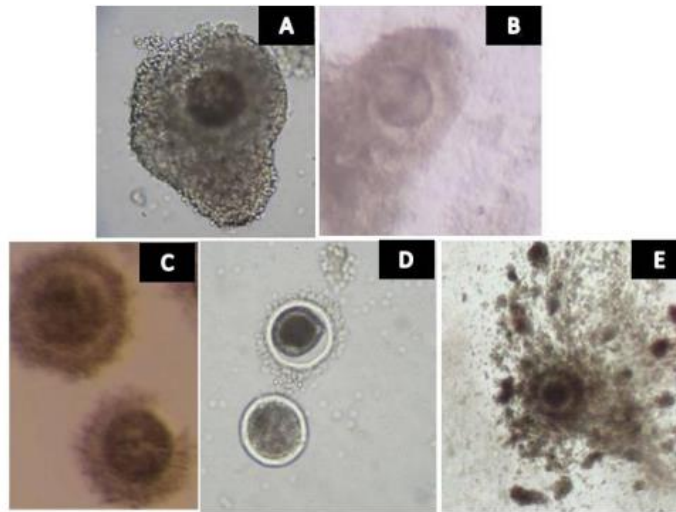


Figura 3. Grados de clasificación de ovocitos según su morfología. Fuente: Modificado de Rodríguez (2013).

2.3.2. Fertilización *in vitro* (FIV)

La FIV es una técnica para la reproducción asistida de mamíferos basada en el cocultivo de espermatozoides y ovocitos en condiciones controladas, para generar cigotos que inicien el desarrollo embrionario con fines de reproducción, investigación y producción de animales seleccionados (Muñoz, 2005). Para poder fertilizar, un espermatozoide debe estar vivo, ser móvil y tener una morfología normal (Saacke, 2003). Para la FIV, la concentración de espermatozoides y ovocitos recomendada está en una relación de 10,000:1 (Fernández *et al.*, 2017). El proceso de FIV busca simular las condiciones *in vivo*, por lo tanto, la capacitación espermática es fundamental también en esta técnica para que el espermatozoide pueda penetrar el ovocito.

En la capacitación espermática, el espermatozoide adquiere la habilidad para llevar a cabo la reacción acrosomal. Este proceso integra cambios en la fisiología celular y bioquímica del espermatozoide, como alteraciones en las proteínas de superficie, cambios en las propiedades de la membrana (composición de lípidos, asimetría de los fosfolípidos y la distribución lateral de lípidos y proteínas de la membrana) (Moore, 2001; Florman y Ducibella, 2006).

Las células del cúmulo (CC) son muy importantes en la interacción del ovocito con el espermatozoide. Controlan el acceso de los espermatozoides a la ZP y, por lo tanto, al ovocito, actúan como una barrera que separa a los espermatozoides con

morfología anormal, a los que no estén completamente capacitados, aquellos que no lleven a cabo la reacción acrosomal y a los que presenten baja movilidad (Florman y Ducibella, 2006). Además, algunos estudios han reportado que los espermatozoides tienen un receptor para hialuronano que se une a la matriz extracelular de las CC, la cual es rica en este compuesto (Joo Yi y Sutovsky, 2011). Sin embargo, en el proceso de FIV los ovocitos tienen que ser desnudos, es decir, desprovistos de las CC; inicialmente, para identificar la extrusión del primer cuerpo polar indicativo de la MII y, segundo, para poder manipularlos de manera más accesible. A pesar de la importancia reportada de las CC, en FIV no se han hecho imprescindibles para que ocurra el proceso de fecundación (Cuadrado, 2012).

Otro proceso importante tanto en la fertilización *in vivo* como *in vitro* es la reacción acrosomal del espermatozoide, ya que sin ésta no se genera la penetración del espermatozoide a la ZP del ovocito. Los espermatozoides de mamíferos contienen una vesícula secretora o acrosoma en la región apical de la cabeza, por arriba del núcleo, la cual está dividida en tres regiones: una membrana acrosomal interna, una membrana acrosomal externa por debajo de la membrana plasmática y un segmento ecuatorial, donde están los dominios de unión de la membrana del espermatozoide. Este acrosoma contiene una amplia variedad de enzimas con actividad proteolítica y enzimática, péptidos bioactivos y otras proteínas (Florman y Ducibella, 2006). Durante la reacción acrosomal, el contenido del acrosoma es liberado por exocitosis en donde se fusionan la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide (Moore, 2001; Florman y Ducibella, 2006; Joo Yi y Sutovsky, 2011). A partir de este proceso se genera la penetración del ovocito. Después de que el espermatozoide penetra la ZP, llega al espacio perivitelino y allí se adhiere y fusiona con la membrana plasmática del ovocito, denominada oolema. Finalizada la fertilización, el ovocito maduro reanuda la meiosis y continúa con la segunda división meiótica hasta completarse y generar la expulsión del segundo cuerpo polar (Tsafri y Dekel, 2011).

El tratamiento del semen dependerá de su origen (descongelado o fresco); pero básicamente lo que se utiliza como regla general es el lavado de los espermatozoides y esto se realiza por medio de diferentes técnicas (sedimentación, centrifugación, entre otros) que su objetivo es la separación de los espermatozoides del plasma seminal y reconstitución en un medio de cultivo. Este lavado permite una mejor valoración morfológica, además, de en el caso de semen descongelado la eliminación del crioprotector (Torres *et al.*, 2019). Es fundamental para el proceso de FIV la capacitación y selección de los espermatozoides con mayor motilidad, ya que de esto depende el éxito de cualquier fertilización, uno de los métodos utilizados y actualmente el más común en este tipo de técnicas es el swim up, el cual permite seleccionar únicamente los espermatozoides con mayor motilidad para el proceso

de FIV. Décadas atrás, también se mencionaba la eficiencia del gradiente de Percoll el cual se utilizaba regularmente en pruebas de fertilidad masculina en humanos, siendo reportado por algunos autores con mejores resultados vs swim up (Bolton y Braude, 1984).

El porcentaje de éxito en FIV de ovinos es aún muy bajo (<40%) debido a diversos factores del ovocito, tales como la raza materna y el origen del semen para llevar a cabo la FIV; por tanto, su desarrollo en pequeños rumiantes resulta un área con potencial importante (Tibary, Anouassi, & Khatir, 2005).

2.3.3. Desarrollo *in vitro* (DIV)

El desarrollo de embriones ovinos dura en promedio 7 días. Los 4 primeros días se espera la división de los cigotos hasta la etapa de mórula y posteriormente, en los siguientes 3 días de cultivo, se formarán los blastocistos tempranos (Gibbson y Cueto, 2013).

Aproximadamente el 80% de los ovocitos sometidos a FIV comienzan a dividirse, al menos, hasta la etapa de la segmentación embrionaria de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza la etapa de blastocisto o blastocisto expandido luego de 6-7 días de cultivo. Esto indica que la DIV, correspondiente al paso más prolongado dentro del proceso de producción *in vitro* de embriones, es el período en el que se establece el mayor porcentaje de pérdidas del sistema. A su vez, durante esta etapa se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos (Rodríguez *et al.*, 2017).

2.4. DESARROLLO EMBRIONARIO

El proceso final de la fecundación *in vivo* y la FIV es la fusión de los pronúcleos masculino y femenino, proceso conocido como singamia, para que el cigoto entre en su primer estado de embriogénesis (Senger, 2003).

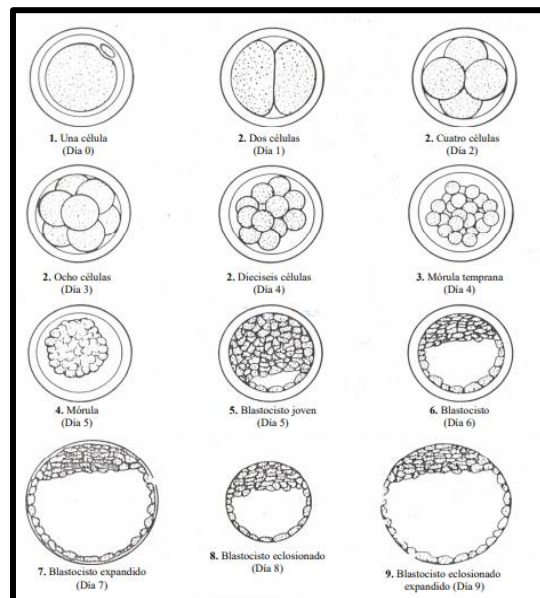
La segmentación es considerada la primera fase de la embriogénesis, desde la etapa de cigoto hasta la de blastocisto (Figura 4). *In vivo*, el desarrollo del embrión inicia en el oviducto y se continúa en el útero, por lo tanto, el fluido oviductal es esencial para las primeras etapas de este desarrollo. Este fluido está compuesto por las trasudaciones de la sangre y las secreciones de las células del epitelio del oviducto. En el ovino, los embriones serán colocados en este fluido por tres días después de la fertilización y llevarán a cabo las tres primeras divisiones para alcanzar las etapas de 2, 4 y 8 blastómeros, a las 24 h, 1.3 y 2.5 días, respectivamente (Senger, 2003; Forcada *et al.*, 2009). Durante el desarrollo de los embriones de 8 a 16 blastómeros, se inicia la transcripción del genoma embrionario.

Este periodo está regulado por un cambio sutil en la composición del fluido oviductal, inducido por estímulos endocrinos y por 15 señales autocrinas y paracrinas. Las etapas de mórula, mórula compacta y blastocisto se desarrollarán en el útero a los 3-5 y 6-9 días, respectivamente (Senger, 2003; Forcada *et al.*, 2009).

Los blastómeros de embriones en ovinos de 2, 4 y 8 células son totipotenciales (Senger, 2003). El embrión de 16 blastómeros se conoce como mórula, y en este momento los blastómeros se diferencian conforme a su posición y dejan de ser totipotenciales. Los procesos combinados de aplastamiento de los blastómeros y polarización son conocidos como compactación (Hafez, 1996; Watson y Barcroft, 2001) e incluyen eventos celulares como: El desarrollo de células adherentes dependientes de calcio (cadherinas), la generación de uniones comunicantes y la aparición de uniones estrechas focales que dividen a la membrana plasmática de los blastómeros en regiones apicales y basolaterales (Watson y Barcroft, 2001).

En una mórula, las células que se posicionan en la periferia formarán entre ellas uniones estrechas que originarán a las células del trofoblasto o trofoectodermo, mientras que las células centrales formarán uniones comunicantes formando la masa celular interna (MCI). Ambos tipos celulares dejarán un espacio lleno de líquido (blastocelo) entre ellas y de este modo se formará el blastocisto (Senger, 2003). La transición de una mórula a blastocisto es un proceso dinámico entre los blastómeros que forman los dos tipos celulares: las células del trofoblasto y las de la MCI (Watson y Barcroft, 2001; Senger, 2003).

Figura 4. Esquema de la cronología del desarrollo embrionario en la oveja (días post celo).



El código para la etapa del desarrollo es numérico. 1. Identifica un ovocito no fertilizado o un embrión de un blastómero. 2. Identifica embriones con 2 a 16 blastómeros. 3. Identifica una mórula temprana. 4-9. Identifica etapas embrionarias de compactación. Tomado de Gibbons y Cueto, 2013.

2.5. CRIOCONSERVACIÓN DE EMBRIONES PRODUCIDOS *in vitro*

El concepto de la vitrificación es básicamente diferente a la de congelación por enfriamiento lento, debido a que éste no es un proceso lento; por el contrario, es un proceso muy rápido. Un ritmo lento de enfriamiento intenta mantener un delicado equilibrio entre los diversos factores, que pueden provocar daños, como la formación de cristales de hielo, daño osmótico, efecto tóxico de los crio protectores, electrolitos intracelulares concentrados, daño por frío, fractura de zona y embrión, y alteraciones intracelulares, citoesqueleto y contactos de célula a célula (Moro *et al.*, 2020), mientras que la vitrificación elimina totalmente la formación de cristales de hielo, debido al proceso de deshidratación al que es sometida la célula.

Desde 1985 (Rall y Fahy 1985), la vitrificación se ha utilizado como un método eficaz en la crio conservación de embriones; pero estos han sido principalmente para la investigación. Algunos autores han reportado algunas limitaciones que posee esta técnica, como la toxicidad por la exposición a altas concentraciones de crio protectores y el daño causado por el choque osmótico. Sin embargo, la vitrificación ha demostrado ser más eficaz para la crio conservación de embriones sensibles a la congelación como los embriones producidos de manera *in vitro* (Wurth *et al.*, 1994). Sin embargo, también se han reportado ventajas como no requerir costosos congeladores de células utilizados para procedimientos de congelación lenta, el equilibrio y posterior vitrificación toma menos tiempo por embrión. Actualmente se han reportado una gran variedad de protocolos en la literatura (Martínez *et al.*, 1998, 2002; Kaidi *et al.*, 1999, 2000; Park *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2000; Sosa y Hansen, 2019), lo que brinda mayores oportunidades para llevar a cabo esta técnica.

La velocidad de enfriamiento es uno de los pilares que determina si la técnica de crio conservación es lenta o vitrificación (rápida). Se determinó que la vitrificación se podía lograr sumergiendo una pajilla de inseminación sellada de 0.25 mL directamente en nitrógeno líquido (Palasz y Mapletoft, 1996). Estas velocidades de enfriamiento requieren el uso de una concentración de crio protectores de aproximadamente 5 a 7 M, que más alta que la necesaria para la congelación de equilibrio tradicional (congelación lenta) aproximadamente 1 a 2 M; (Rall, 1987; Massip *et al.*, 1989). La vitrificación de embriones es una técnica de reproducción asistida utilizada para conservar y preservar los embriones resultantes de la FIV, los cuales no han sido transferidos (Moro *et al.*, 2020). El principio se basa en someter

a los embriones a una alta concentración de crioprotectores, en bajos volúmenes de solución para evitar la formación de cristales de hielo (Gibbons y Cueto, 2013).

Existen reportados diferentes protocolos de vitrificación, los más comunes vitrificación de tres pasos (Walker *et al.*, 2006), One Step (Juárez *et al.*, 2018) y Open Pulled Straw (OPS) (Sosa & Hansen, 2019). Durante la vitrificación, la velocidad de enfriamiento es ultrarápida ($107^{\circ}\text{C}/\text{seg}$) y la concentración utilizada de crioprotectores es alta, pero en poco volumen. Estas características hacen que los efectos tóxicos y las lesiones osmóticas causadas por el crioprotector, disminuyan. Igualmente, minimizar el volumen de la muestra y combinarlo con un enfriamiento acelerado, permite reducir la concentración de crioprotectores y la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelular, que es uno de los daños más comunes (Ramírez y Bernal, 2012).

La tasa de supervivencia post vitrificación en embriones ovinos, partiendo de que los embriones que post calentamiento que logran la reexpansión sobrevivieron a la vitrificación, se reporta de 65.9% en mórulas y en blastocistos desde 85 hasta 94.3%. La tasa de preñez con embriones post vitrificados transferidos en ovinos mejora entre el día 7 y 8 de transferencia desde un 21 hasta 55.9% respectivamente, lo que en general sería un porcentaje de eficiencia entre 20 hasta 47.5% en embriones post vitrificados transferidos en ovinos (Gibbons *et al.*, 2011; 2019).

2.6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) Y ESTRÉS OXIDANTE

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son un grupo de moléculas generadas a través de la reducción parcial del oxígeno molecular; la mayoría de estas especies (excepto el peróxido de hidrógeno), poseen uno o más electrones desapareados, configuración a la que se le denomina radical libre. En condiciones basales, el metabolismo aeróbico está vinculado con la producción de ERO, tales como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^-), mientras que las especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico (NO), son formadas por la conversión de L-arginina a L-citrulina por efecto de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Cuando se presenta una producción exagerada de ERO que excede la defensa celular, ocurre un estrés oxidativo (Viada *et al.*, 2017). Ello genera un daño oxidativo a biomoléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, lo que induce a cambios estructurales y funcionales, como los hidroperóxidos de lípidos, las proteínas carboniladas (Torres *et al.*, 2019) y el ADN con bases oxidadas (Venereo, 2002).

Entre las fuentes exógenas de ERO, se encuentran los factores ambientales como la crioconservación, la concentración de oxígeno, la fuente de energía, el medio de

cultivo y la luz (Torres *et al.*, 2019). Se ha reportado, además, que la exposición a altas concentraciones de oxígeno (20 % en aire), potencia el aumento de los niveles de ERO, disminuyendo los porcentajes de desarrollo embrionario en especies animales como los murinos, porcinos, caprinos y bovinos generando un arresto en el desarrollo, daños en el ADN, apoptosis y peroxidación lipídica, de este modo se ve afectada la competencia embrionaria (Takahashi *et al.*, 2000; Takahashi, 2012).

Por otra parte, dependiendo de su composición y suplementos, los medios de cultivo de embriones pueden contribuir en la producción de ERO. Algunos medios de cultivo comúnmente utilizados (TCM-199 y TALP), incluyen iones metálicos como el Fe^{2+} y Cu^{2+} , los cuales inducen la formación de ERO a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. En el caso del hierro, éste puede actuar sobre los lípidos generando peroxidación lipídica iniciada por radicales hidroxilos libres (Guerin, 2001). Sin embargo, se ha observado que la adición del cobre, principalmente durante la MIV de ovocitos, favorece el desarrollo embrionario temprano (Rosa, 2015).

La suplementación de los medios de cultivo con fluidos biológicos como el suero fetal bovino (SBF por sus siglas en inglés), puede aumentar los niveles de ERO en relación con otros suplementos como la albumina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés). La presencia de la enzima amino oxidasa en suero, que participa en la oxidación de aminas primarias, genera como producto secundario el H_2O_2 , lo cual podría explicar el efecto del suero sobre el porcentaje de apoptosis, la criotolerancia y el patrón de expresión génica, en embriones bovinos producidos *in vitro* (Torres *et al.*, 2019). Altas concentraciones de glucosa en el medio de MIV también aumentan los niveles de ERO y disminuyen el contenido de glutatión (GSH) intracelular en ovocitos bovinos, inhibiendo las enzimas responsables de la síntesis de GSH y afectando así la capacidad de los ovocitos para reducir las ERO. Además, las ERO pueden causar peroxidación lipídica de la membrana celular de los embriones, fragmentación del ADN y afectar la síntesis de proteínas (Escobar, 2021).

2.7. BIOSÍNTESIS DEL RESVERATROL

La síntesis del trans-resveratrol inicia con la biotransformación de la fenilalanina y tiene lugar mediante la condensación de una molécula de cumaril-CoA con 3 de malonil-CoA (Figura 5). Esta reacción está catalizada por la enzima resveratrol sintetasa, una enzima que pertenece a la familia de las estilbeno sintetasas (Escobar, 2021). Esta familia de enzimas es codificada por genes que son sensibles a señales externas, incluyendo estrés abiótico o señales bióticas originadas por células fúngicas (Gambini *et al.*, 2013; Martínez, 2016).

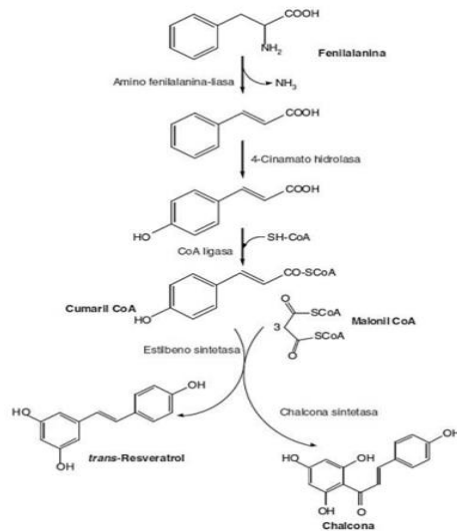


Figura 5. Biosíntesis del resveratrol. Tomado de Gambini *et al.*, 2013.

El resveratrol, al igual que otros polifenoles, puede sufrir un proceso de autooxidación, lo que conlleva a la producción de O_2^- , H_2O_2 y una mezcla compleja de semiquinonas y quinonas que pueden llegar a ser citotóxicas (Escobar, 2021).

Estos eventos de auto-oxidación o degradación son muy importantes, ya que el resveratrol oxidado podría generar complejos con otras moléculas como iones de cobre. Aproximadamente 20% de cobre se encuentra en el núcleo de las células y está estrechamente asociado con las bases de DNA en particular con guanina (Zhen *et al.*, 2020).

El mecanismo citotóxico del resveratrol, probablemente involucra la movilización de iones de cobre. En primer lugar, el resveratrol se somete a oxidación en presencia de $Cu(II)$, de hecho, el producto oxidativo del resveratrol es un dímero, y la transferencia inicial de electrones genera la reducción de $Cu(II)$ a $Cu(I)$ (Figura 6). Esta molécula de resveratrol oxidada puede generar complejos con el cobre, los cuales son capaces de fragmentar al DNA (Zhen *et al.*, 2020).

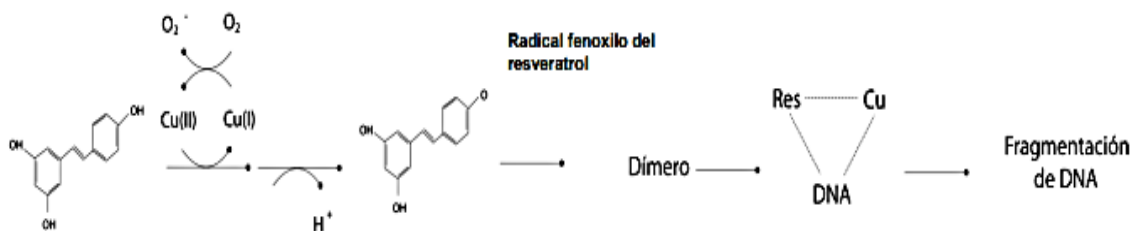


Figura 6. Mecanismo citotóxico del resveratrol. Tomado de Palacios, 2014.

2.7.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante del resveratrol se debe a su estructura molecular, la cual presenta un grupo hidroxilo (OH) en el anillo A y un sistema de doble enlace conjugado que provoca una deslocalización electrónica (Figura 7). La presencia del grupo OH le brinda al resveratrol la capacidad de transferir un electrón o un átomo de hidrógeno, estabilizando así a los átomos o moléculas con electrones desapareados. Estas características provocan que el resveratrol sea un eficiente “scavenger” (quelante o atrapador de iones) eliminando radicales libres y especies reactivas de oxígeno, como el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($HO\cdot$), el oxígeno singulete (1O_2) y el óxido nítrico (NO) (Hussein, 2017). Además de su estructura molecular, la capacidad antioxidante del resveratrol puede deberse, en parte, a su capacidad de regular la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD (Superóxido dismutasa) y la glutatión peroxidasa. El tratamiento con resveratrol también aumenta la expresión y la translocación nuclear del gen FOXO3a. Los genes FOXO son la primera defensa frente al estrés oxidativo (Martínez, 2016).

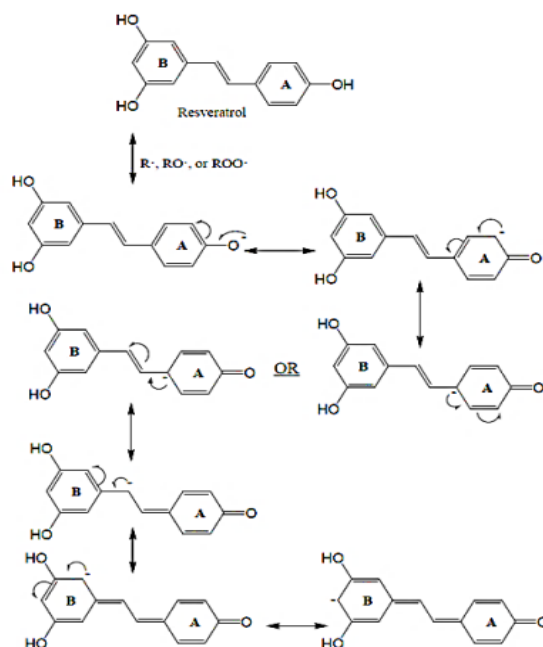


Figura 7. Mecanismo de la actividad antioxidante del resveratrol. Tomado de Hussein, 2017.

2.7.2. GLUTATIÓN (GSH)

El GSH (L-g-glutamil-L-cisteínglicina) es el mayor componente sulfhidrilo no proteico presente en las células de mamíferos a concentraciones de 0.5-10 mmol/L. Es un tiol libre intracelular que tiene importantes funciones biológicas (Figura 8); por

ejemplo, durante la proliferación celular, transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas y ADN, reducción de disulfuros y otros grupos químicos, protección celular contra la oxidación y reserva para la cisteína. El GSH celular juega un papel clave en dichos procesos biológicos; pero notablemente, en la protección de las células contra la oxidación, ya que el grupo sulfhidrilo (SH) es un fuerte nucleófilo, y confiere protección contra el daño causado por oxidantes y radicales libres (Gumbao, 2015).

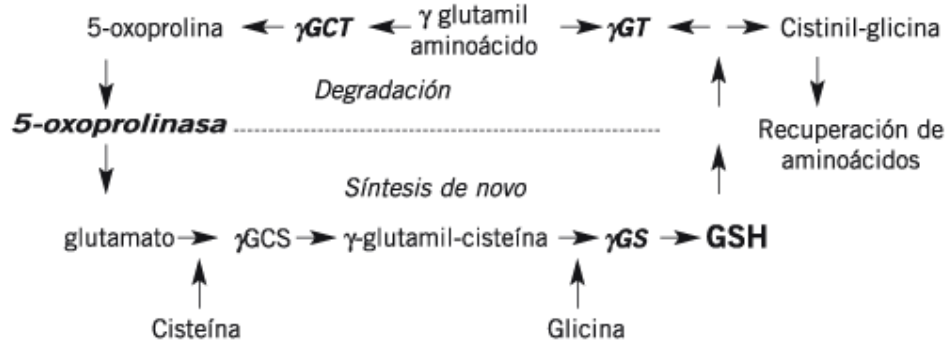


Figura 8. Biosíntesis del Glutathion (GSH). Tomado de Martínez et al., 2016.

En ovocitos bovinos, es considerado un importante marcador bioquímico de la viabilidad y la calidad de ovocitos mamíferos (Zuelke *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha reportado la síntesis de GSH durante la maduración *in vitro*, y su asociación con la formación del pronúcleo masculino después de la fecundación (Miyamura *et al.*, 1995) y el desarrollo embrionario temprano (De Matos *et al.*, 2002).

El GSH, presente en elevadas concentraciones (~ 5 mM) en las células animales, actúa como amortiguador de sulfhidrilos. Pasa cíclicamente de una forma tiol reducida (GSH) a una forma oxidada (GSSG), en la cual los dos tripéptidos están unidos por un puente disulfuro. Esta reacción está catalizada por la glutatión peroxidasa, una enzima que tiene la peculiaridad de contener un átomo de selenio (Se) unido covalentemente en forma de selenocisteína, que resulta esencial para la actividad enzimática (Torres *et al.*, 2019).

El GSH puede considerarse como una especie de tampón redox. Posiblemente ayuda a mantener los grupos sulfhidrilos de las proteínas en su forma reducida y el hierro del grupo hemo en forma de ión ferroso (Fe^{2+}), a la vez que actúa como un agente reductor para la glutarredoxina. Su acción redox puede utilizarse también para la eliminación de los peróxidos tóxicos que se forman durante el crecimiento y en el metabolismo en condiciones anaeróbicas (De Matos *et al.*, 2002).

Las células, al ser privadas de GSH, son más propensas a sufrir estrés oxidativo porque su equilibrio redox está alterado y se ve perjudicada su capacidad para eliminar o detoxificar los diversos agentes oxidantes (ERO) intermediarios que se forman en el metabolismo celular normal. Una extrusión activa del GSH podría favorecer el inicio de la apoptosis al permitir pasivamente que tenga lugar el estrés oxidativo (Martínez, 2016).

3. ANTECEDENTES

Efecto del resveratrol sobre el desarrollo embrionario

Zabihi *et al.* (2021), midieron en ovejas diferentes concentraciones de resveratrol durante la MIV, concluyendo que no hay diferencias significativas en la tasa de MIV, pero que sí mejora la expansión de las células del cúmulo post MIV y la tasa de producción de blastocistos a concentraciones de 0.25 y 0.5 μM . En cuanto a la calidad de los blastocistos, observaron que ésta fue mayor en los embriones producidos a partir de ovocitos tratados con 0.5 μM de resveratrol.

Efecto del uso de antioxidantes en el DIV y producción de ERO

Mukherjee *et al.* (2014), utilizaron cinco concentraciones diferentes de resveratrol (0.1, 0.25, 0.5, 2.0 y 5.0 μM), suplementado en el medio de MIV de ovocitos de vaca y cabra para determinar los niveles de ERO y del GSH en los ovocitos maduros. Concluyeron que a 0.25 y 0.5 μM , se reducen significativamente los niveles de ERO intracelular, aumentan las concentraciones de GSH y se estimula el desarrollo embrionario.

En otro estudio, se utilizó el resveratrol a concentraciones de 0.1, 0.5 y 2.0 μM , durante la MIV de ovocitos de cerda, determinando su efecto sobre los niveles de GSH y de ERO, así como sobre la expresión génica en ovocitos maduros, células del cúmulo y blastocistos derivados de la FIV. Se observó que los COC tratados con 2.0 μM de resveratrol, mostraron una menor expresión de genes relacionados con la apoptosis en comparación con los ovocitos maduros y las células del cúmulo. Las células del cúmulo tratadas con resveratrol a 2.0 μM , mostraron una expresión más alta ($p \leq 0.05$) de antígeno nuclear de células en proliferación que el grupo de control. Concluyendo que el resveratrol (2.0 μM) mejora el potencial de desarrollo de los embriones y disminuye las ERO (Kwak *et al.*, 2012).

Abbasi *et al.*, (2021), también determinaron que a dosis de 2.0 μM , el resveratrol tiene un efecto antienviejecimiento y antiestrés oxidante, lo que les permite a los ovocitos de cerda alcanzar una mayor tasa de MIV, mejorar su calidad y favorece la producción embrionaria. Además, en otras especies como la cabra, regula la expresión de genes anti apoptóticos al alta y los genes pro apoptóticos a la baja, lo cual favorece la producción *in vitro* de embriones (Mukherjee *et al.*, 2014).

Otros autores evaluaron la maduración nuclear y los niveles de ERO en ovocitos de oveja tratados con resveratrol, que posteriormente fueron utilizados como

receptores de núcleos en la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS). También evaluaron su efecto en el desarrollo temprano y la calidad morfológica de los embriones clones. Utilizaron concentraciones de 0, 0.5, 2 y 5 μM de resveratrol y concluyeron que, a 0.5 μM durante la MIV, el resveratrol mejora la calidad de los ovocitos, reduce los niveles de ERO y promueve la compactación de las mórulas clones de *O. aries* (Martínez *et al.*, 2019).

La vitrificación sobre la presencia de ERO y el DIV

En cuanto a la producción de ERO en embriones desvitrificados bovinos, Giraldo (2011) determinó el daño por vitrificación y post vitrificación, a causa del malondialdehído (MDA) producido durante la oxidación de los fosfolípidos. Midió las concentraciones de MDA en medios sometidos a vitrificación y post vitrificación con y sin embriones, encontrando que el medio con embriones sometidos a vitrificación produjo 35.26% más de MDA con respecto al medio sin embriones. Cabe resaltar que estos medios fueron preparados con dimetilsulfoxido (15% DMSO) y con dimetilformamida (15% DMF) como crioprotectores. También pudo determinar que, a mayor concentración de estos crioprotectores (20%), disminuían las concentraciones de MDA, ERO y ácido tiobarbitúrico (TBARs).

En otras especies también se ha estudiado la vitrificación como un factor desencadenante del exceso de producción de ERO. Es el caso de los conejos, donde se ha reportado que la vitrificación de embriones altera, en estado prenatal (embriones de 6 días), siendo este mayor en los embriones vitrificados frente a los no vitrificados (Navarro, 2019).

Se ha comprobado que la generación anormal de ERO inducida por la vitrificación y la acumulación de $\gamma\text{-H2AX}$ el cual es considerado un marcador específico para lesiones del genoma, aumentan la tasa de apoptosis y alteran el ciclo embrionario temprano en ratas. Zhen *et al.*, (2020) concluyeron que el tratamiento con resveratrol podría disminuir los niveles de ERO, la acumulación de $\gamma\text{-H2AX}$ y la tasa de apoptosis, y mejorar la tasa de desarrollo embrionario.

Sin la adición de antioxidantes durante el cultivo embrionario, en ovinos se obtienen tasas de supervivencia embrionaria de alrededor de 59.3% en la vitrificación de "One Step", utilizando como crioprotectora al etilenglicol y la sacarosa (Juárez *et al.*, 2018).

4. JUSTIFICACIÓN

Dado que el resveratrol muestra un efecto antioxidante que favorece la MIV de ovocitos, así como la calidad de los embriones producidos a partir de ellos, en este estudio se evaluó su efecto en la reducción de ERO y en la calidad de los embriones producidos por FIV post vitrificación, en *Ovis aries*.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué efecto tendrá la inclusión del resveratrol durante la MIV en la reducción de ERO y la calidad de los embriones ovinos producidos por FIV posterior a su vitrificación?

6. HIPÓTESIS

El resveratrol suplementado durante la MIV en los ovocitos utilizados para producir embriones ovinos por FIV, tendrá un efecto benéfico sobre la reducción de ERO, la calidad y la tasa de desarrollo de los embriones posterior a la vitrificación.

7. OBJETIVOS

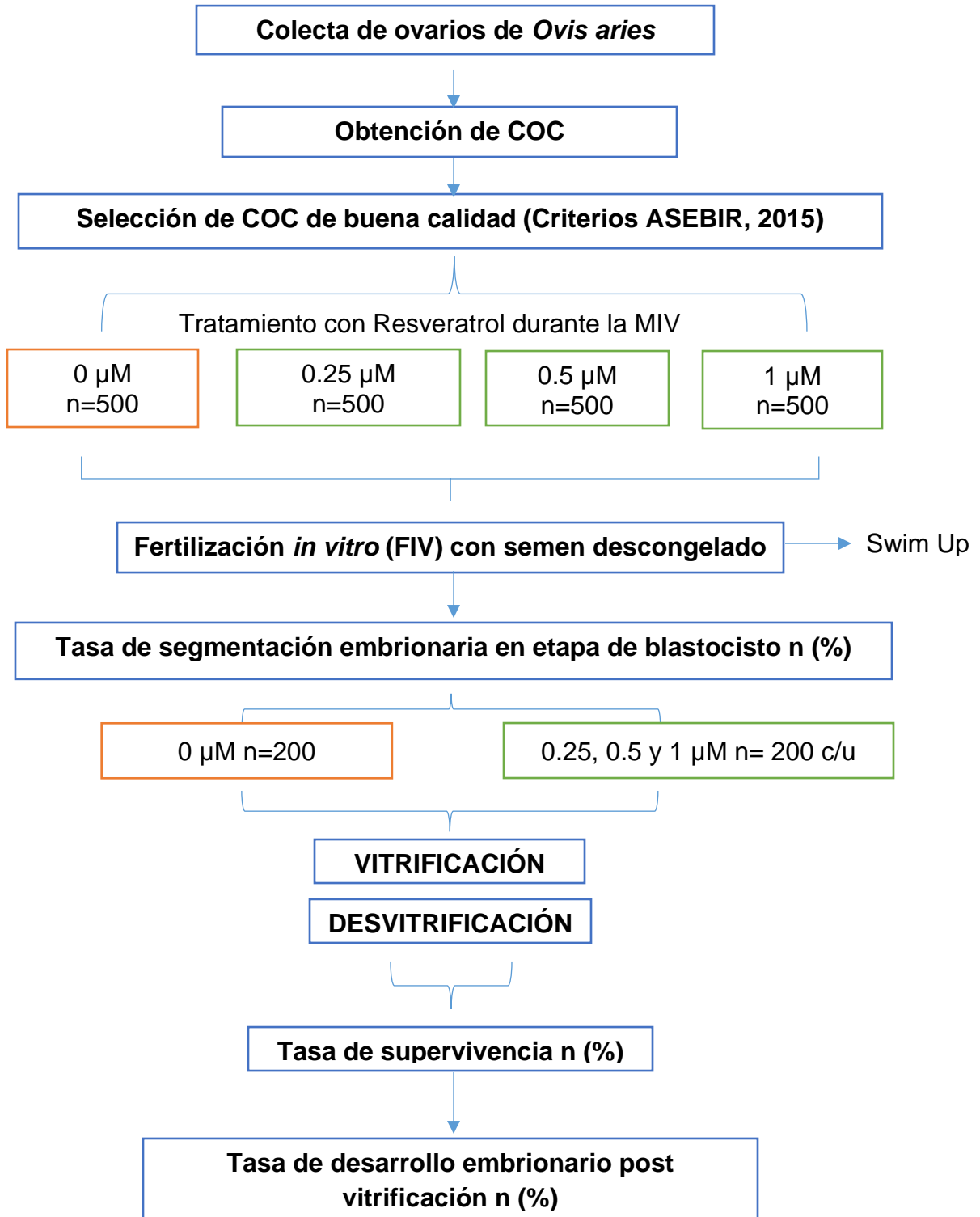
7.1. GENERAL

Evaluar el efecto del resveratrol durante la MIV de ovocitos, sobre la reducción de ERO y la calidad de los embriones producidos por FIV post vitrificación en ovinos.

7.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar el efecto del resveratrol sobre la MIV de ovocitos de *Ovis aries*.
- ✓ Evaluar la capacidad de desarrollo de los embriones producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol.
- ✓ Evaluar la capacidad de desarrollo posterior a la vitrificación de los embriones producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol.
- ✓ Determinar el efecto del resveratrol sobre la presencia de ERO en los embriones producidos.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL



9. METODOLOGÍA

Los productos químicos y reactivos utilizados en esta tesis fueron de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EE. UU.), a menos que se especifique lo contrario. Los embriones de *O. aries* producidos por FIV fueron incubados a condiciones de 38.5 °C y 5% de CO₂, en atmósfera humidificada a saturación.

Basado en Martínez *et al.* (2019), se consideraron 4 tratamientos: tres para el grupo experimental en donde los embriones fueron producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con 0.25 µM, 0.5 µM y 1 µM de resveratrol durante la MIV. El grupo control, consistió en embriones producidos por FIV a partir de ovocitos sin resveratrol (0 µM).

Se registraron los efectos observados de los 3 tratamientos con resveratrol (0.25, 0.5 y 1 µM) sobre la MIV, la FIV y el DIV de los embriones producidos de *O. aries*.

9.1. COLECTA DE OVOCITOS

Siguiendo la metodología descrita por Martínez *et al.* (2019), se colectaron ovocitos por aspiración/punción de folículos ováricos (de 2 a 5 mm de diámetro), provenientes de ovejas sacrificadas en un rastro local. Los ovarios fueron transportados al laboratorio durante 2 h a una temperatura de 30-35 °C en solución salina (NaCl al 0.9%) y antibióticos al 1% (10.000 UI/mL de penicilina, 10 mg/mL de sulfato de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina) (Antibac-Antifun 100x, *In Vitro*, SA). Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron 3 veces en solución salina isotérmica con antibióticos. Posteriormente, los COC fueron colectados de los folículos, puncionándolos con jeringas de 10 mL conteniendo 0.5 a 1 mL de medio de colecta TCM 199® con HEPES (25mM) suplementado con heparina (100UI/mL) y con agujas calibre 20 G. Este medio se atemperó a 30°C 1-2 h antes. Los COC obtenidos se evaluaron y se seleccionaron para la MIV, aplicando los criterios de la ASEBIR (2015).

Los COC seleccionados se dividieron en los cuatro tratamientos mencionados (0 µM, 0.25 µM, 0.5 µM y 1 µM de resveratrol).

9.2. MADURACIÓN *in vitro* (MIV) DE OVOCITOS DE *O. aries*

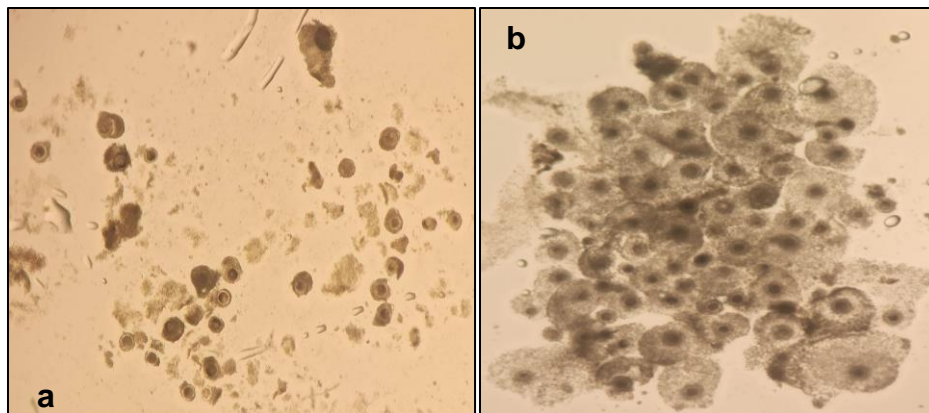
La MIV se llevó a cabo utilizando el medio Tissue Culture Medium 199 (TCM - 199®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Microlab), 1% de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 5 µg/mL de hormona estimulante del folículo (FSH)

(Folltropin-V, Bioniche), gonadotropina coriónica equina (eCG) 5 UI/mL (Loeffler) y antibióticos al 0.6%. Posteriormente, los ovocitos se cultivaron en grupos de 25 a 30 en una caja de cuatro pozos conteniendo 400 μ L de medio de MIV cubiertos con 200 μ L de aceite mineral, durante 20 h en incubación a las condiciones señaladas (Martínez *et al.*, 2019). Para los tratamientos experimentales el medio de MIV se suplementó con las diferentes concentraciones de resveratrol (0.25 μ M; 0.5 μ M y 1 μ M, respectivamente).

Una vez transcurrida la MIV, con el fin de determinar si los ovocitos se encontraban en Metafase II (MII), se valoraron por características cualitativas como el grado de expansión de las de los COC en cada tratamiento, calificando ésta como buena, media y baja, siendo esta última una calificación para los tratamientos donde los ovocitos no presentaran expansión de los COC (Figura 9). Adicionalmente, se tomó una muestra del 10% de cada tratamiento para evaluar la presencia del primer cuerpo polar y determinar la tasa de MIV por grupo.

Para ello, los ovocitos fueron desnudados de las CC depositándolos en tubos Eppendorf conteniendo una solución de 0.5mg/mL de hialuronidasa e incubándolos por 5 minutos a las condiciones descritas. Una vez transcurrido el tiempo, el contenido del tubo se resuspendió suavemente varias veces con una micropipeta (200 μ L) y se vació en una caja Petri, evaluando bajo el microscopio estereoscópico que los ovocitos estuvieran desprovistos de las CC y que presentaran el primer cuerpo polar. Se realizó nuevamente la selección de los ovocitos en cada uno de los tratamientos bajo los criterios de la ASEBIR (2015), para la siguiente etapa experimental (FIV).

Figura 9. Maduración *in vitro* de ovocitos de *O. aries*.



a. Ovocitos inmaduros aspirados por punción de ovarios de ovejas post mortem. Aumento a 5X. b. Ovocitos de oveja con expansión de las CC posterior a 20 h de MIV. Aumento a 10X. Fuente: *Archivo personal, 2022*.

9.3. FERTILIZACIÓN *in vitro* (FIV) y DESARROLLO *in vitro* (DIV) DE EMBRIONES DE *O. aries*

Los ovocitos en MII fueron lavados en gotas de 50 μ L con medio de fertilización atemperado a 38.5°C BO-IVF™ (IVF Bioscience) bajo aceite mineral y puestos en una gota de medio BO-FIV™ atemperado, en una caja de cuatro pozos, a una relación de 100 μ L/30 ovocitos (Filipiak *et al.*, 2017).

En cuanto al semen, se utilizaron pajillas crioconservadas a -196°C (una pajilla de 0.25 mL por cada experimento) de ovinos fértiles, que se descongelaron en baño María a 37°C, vaciando su contenido en tubos Eppendorf. Se tomó una microgota de 50 μ L para evaluar la movilidad espermática post descongelación. Se realizó “Swim up” en medio de MIV que se recuperó de aquellos ovocitos que fueron puestos a madurar del grupo control y que se centrifugó (Magdanz *et al.*, 2019; Salgado & Lopera, 2020).

La técnica “Swim up” se basó en la metodología de García (2009). Se realizó una dilución 1:3 de la muestra seminal en el medio MIV recuperado y pre centrifugado. Posteriormente el tubo se centrifugó durante 3 minutos a 1,200 rpm, y se retiró el sobrenadante conservando el tapón celular. Nuevamente se agregó la misma cantidad de medio MIV en el tubo, inclinándolo y dejándolo correr suavemente por las paredes del tubo. Se incubó 40 minutos a las condiciones descritas inclinado a 45° (Wan *et al.* 2009).

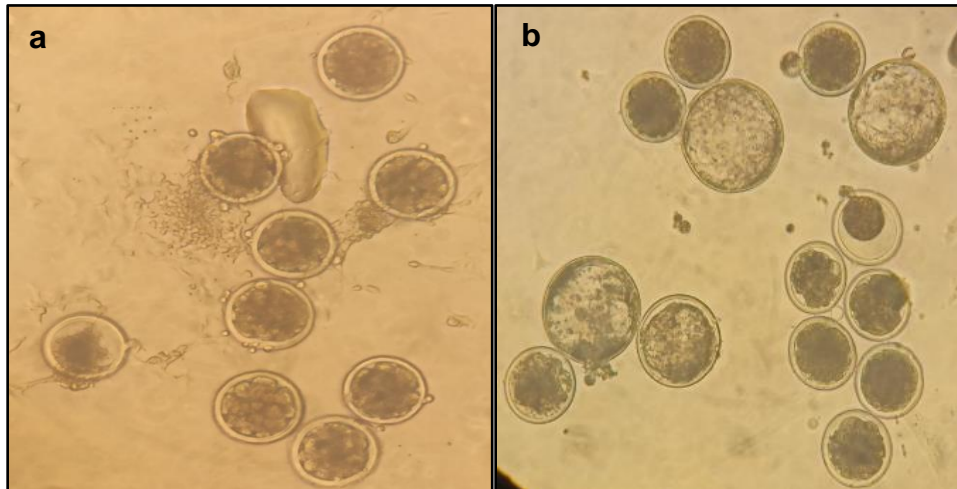
Se tomaron 10 μ L de muestra de la parte superior del tubo y se adicionaron a 100 μ L de medio FIV en cajas de 4 pozos, depositando una concentración de 28 x 10⁶/mL de espermatozoides. Este medio FIV ya contenía los ovocitos de cada tratamiento. Las cajas se llevaron a incubación a las condiciones descritas, durante 24 h (Morton *et al.*, 2005)

Finalizadas las 24 h de incubación, para retirar las CC y los remanentes de espermatozoides, se utilizó la enzima hialuronidasa de la misma forma que se mencionó posterior a la MIV para el 10% de los ovocitos muestra. Los ovocitos fertilizados (ahora presuntos cigotos) fueron lavados dos veces en gotas de 50 μ L de medio de DIV Cleavage (Cook Medical®) y se transfirieron a una nueva caja de cultivo colocando 25 cigotos por cada gota de 50 μ L del medio cubierto con aceite mineral. Luego se incubaron a las mismas condiciones descritas durante 4 días de cultivo.

Al día 5 de cultivo, los embriones fueron lavados dos veces en gotas de 50 μ L de medio de DIV Blastocyst (Cook Medical®), se transfirieron a la caja de cultivo

correspondiente conteniendo 50 μL de medio Blastocyst y se incubaron durante 7 días (Martínez *et al.*, 2019). La tasa de DIV y la evaluación morfológica de los embriones obtenidos en cada tratamiento, se realizó bajo microscopio invertido los días 4 y 7 de cultivo (Figura 10), utilizando los criterios del Manual de la IETS y de la ASEBIR (2015). La tasa final de producción embrionaria se determinó el día 7 post-FIV.

Figura 10. Desarrollo *in vitro* de embriones obtenidos por FIV a partir de ovocitos aspirados de *Ovis aries* post mortem.



a. Segmentación embrionaria al día 4 de DIV. b. Segmentación embrionaria y producción de blastocistos en diferentes etapas al día 7 de DIV. Aumento 10 X. Fuente: *Archivo personal, 2022.*

9.4. VITRIFICACIÓN Y POST VITRIFICACIÓN

Siguiendo la metodología descrita por Sosa y Hansen (2019), el día 5 de cultivo los blastocistos tempranos (calidad buena y excelente) de cada grupo experimental, fueron vitrificados mediante la técnica Open Pulled Straw (OPS). (Vajta *et al.*, 2000). Para la vitrificación y post vitrificación, previamente se incubaron los medios preparados y descritos a continuación durante 15 min en condiciones ya descritas.

9.4.1. VITRIFICACIÓN

Inicialmente, los embriones se lavaron en 800 μL de medio Holding (TCM-199 sin HEPES suplementado con 10% SFB) en un pozo de una caja de cultivo de cuatro pozos. Posteriormente, se depositaron en otro pozo con 600 μL de medio Holding suplementado con 7.5% de etilenglicol y 7.5% de DMSO durante 3 min. Pasado este tiempo se colocaron en un tercer pozo con 600 μL de medio Holding suplementado con sacarosa (3.42g/10mL) y 16.5% de etilenglicol y 16.5% de DMSO. Allí permanecieron 20 seg. Inmediatamente después, se formaron microgotas de 2 μL

con los embriones, colocándolas en un espacio libre de medio de la caja de cultivo. Estas microgotas con embriones se recogieron por capilaridad en una OPS. Las OPS cargadas se colocaron dentro de otra pajilla común (0.5 mL) y a la vez éstas se colocaron dentro de un recipiente con nitrógeno líquido. Finalmente se sellaron por calor para sumergirlas en el tanque de nitrógeno líquido hasta su uso.

9.4.2. DESVITRIFICACIÓN

Pasadas 24 h de la vitrificación, las OPS de cada grupo se descongelaron mediante la técnica de 3 pasos (Sosa y Hansen, 2019) para su desvitrificación. Primero, se retiró la pajilla del tanque de nitrógeno y la punta de la OPS se introdujo en el primer pozo (de una caja de cultivo de 4 pozos) conteniendo 400 μ L de medio Holding suplementado con 50% de sacarosa, dejando los embriones allí por 5 minutos. Luego se pasaron al segundo pozo el cual contenía el mismo medio repitiendo el tiempo de lavado. Luego, los embriones se colocaron en un tercer pozo conteniendo 1000 μ L de medio Holding suplementado con 25% de sacarosa, durante 5 minutos. Finalmente, fueron lavados en un cuarto pozo con 400 μ L de medio holding por 5 minutos.

Los embriones desvitrificados fueron cultivados en las condiciones ya descritas, hasta cumplir 48 horas de cultivo. Se cultivaron por separado (según cada tratamiento) en medio Blastocyst (Cook Medical®), para evaluar su capacidad de desarrollo embrionario hasta blastocisto tardío y eclosionado (González, 2020).

Para el análisis estadístico se consideró el número y porcentaje de blastocistos que continuaron su desarrollo (blastocistos tardíos y eclosionados).

9.5. NIVELES DE ERO EN EMBRIONES DESVITRIFICADOS

Para determinar los niveles de ERO en los embriones desvitrificados de cada grupo tratado, se utilizó la metodología descrita por Martínez *et al.* (2019). Finalizadas las 48 h de DIV post vitrificación (día 7 de cultivo), al medio que contenía los embriones se le adicionaron 10 μ M de DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluoresceina diacetato) y se dejaron incubando 30 min a las condiciones ya descritas, cubriendo la caja de cultivo con papel aluminio.

Posteriormente, se realizaron tres lavados a los embriones en gotas de 100 μ L de PBS (Phosphate Buffered Saline) y finalmente se montaron sobre un portaobjetos, cubriéndolos con un cubreobjetos. Se evaluaron en un microscopio de epifluorescencia con filtro UV de 460 nm y se tomaron fotografías. Una vez obtenidas las imágenes de cada grupo, se procedió a analizarlas para determinar la intensidad de fluorescencia en el software Image J (Versión 1.41; National Institute

of Health, Bethesda, MD, EUA). A mayor intensidad de fluorescencia, se consideró la presencia de una mayor cantidad de ERO en los embriones.

9.6. NIVELES DE GLUTATION (GSH) EN EMBRIONES DESVITRIFICADOS

Para determinar los niveles de Glutation (GSH) en embriones desvitrificados, se utilizó la metodología descrita por Nadri *et al.* (2022). Finalizadas las 48 h de cultivo de DIV post vitrificación, junto con la tinción DCFH-DA ya descrita, al medio que contenía los embriones se le adicionaron, además, 10 μ M de la tinción Cell Tracker Blue® y se siguieron los pasos ya descritos.

En este caso se utilizó un filtro UV de 405 nm. Una vez obtenidas las imágenes de cada grupo, también se analizaron en el software Image J. A mayor intensidad de fluorescencia, se consideró la presencia de una mayor cantidad de GSH en los embriones.

9.7. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA

Posterior a la vitrificación, siguiendo la metodología de Martínez *et al.* (2019), el día 7 de cultivo se determinó el número de núcleos presentes en los blastocistos. Para ello, los embriones de cada grupo se lavaron 2 min en 100 μ L de solución salina amortiguada por fosfatos de Dulbecco (DPBS), sin calcio, ni magnesio (*In vitro*, S. A.), suplementado con 2% de antibiótico y antimicótico 100X (10,000 UI/mL de Penicilina G Sódica, 10,000 μ g/mL de sulfato de estreptomycin y 25 μ g/mL de Anfotericina B solubilizada, *In vitro* S.A) después se fijaron 24 h en 400 μ L de paraformaldehído al 4%, en refrigeración. Posteriormente se depositaron en una gota de 2 μ L sobre un portaobjetos, retirando el exceso del fijador y se adicionaron 10 μ L de una solución al 2.5% de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en DPBS, para luego ser cubiertas con un cubre objetos. Se utilizó un filtro UV de 405 nm para evaluarlos. Una vez obtenidas las imágenes de cada grupo se analizaron realizando el conteo de núcleos de cada uno de los embriones por tratamiento.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables de respuesta analizadas fueron: Tasa de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, de segmentación embrionaria, de desarrollo *in vitro* (DIV), de blastocistos con capacidad de desarrollo post vitrificación, presencia de ERO, GSH y calidad embrionaria. Estas variables fueron analizadas considerando al grupo control y los experimentales (diferentes concentraciones de resveratrol) mediante prueba T de Student para muestras pareadas. Se utilizó un ANDEVA de una Vía considerando las variables de respuesta intragrupos, seguida de la prueba de Duncan. Estos estadísticos se evaluaron a significancia de $p < 0.05$.

11. RESULTADOS

11.1. COLECTA DE OVOCITOS

Se colectaron 815 ovarios de ovejas domésticas (*O. aries*) de un rastro local, obteniéndose una tasa de aspiración promedio de 7 ovocitos / ovario.

Las variables analizadas en esta tesis fueron: tasa de MIV de ovocitos tratados con las diferentes concentraciones de resveratrol (0 μ M; 0.25 μ M; 0.5 μ M y 1 μ M), tasa de segmentación embrionaria y tasa de blastocistos.

11.2. MADURACIÓN *in vitro* (MIV) DE OVOCITOS, TASAS DE SEGMENTACIÓN EMBRIONARIA Y DE DESARROLLO A BLASTOCISTOS, EN *O. aries*.

El resveratrol utilizado durante la MIV de ovocitos de ovino mostró un aumento en las tasas de MIV a concentraciones de 0.5 y 1 μ M, con diferencias significativas entre 0.25 y 1 μ M ($p \leq 0.05$), siendo mayores en esta última (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de MIV, DIV y de blastocistos de *O. aries* a partir de ovocitos tratados con resveratrol (Porcentaje \pm EE).

RESVERATROL	0 μ M	0.25 μ M	0.5 μ M	1 μ M	P
MIV	75 \pm 6.5	74 \pm 8.5 ^a	81 \pm 6.1	81 \pm 6.5 ^b	0.04
SEGMENTACIÓN (DIV)	63.1 \pm 5.4 ^a	60 \pm 4.6	68.6 \pm 4.7	69.2 \pm 4.7 ^b	0.05
BLASTOCISTOS AL DÍA 4 DE DIV	8.4 \pm 3.4	13.5 \pm 4.1	16.2 \pm 6	16.8 \pm 6.5	≥ 0.05
BLASTOCISTOS AL DÍA 7 DE DIV	30.2 \pm 3.9	25.6 \pm 3.1	30.2 \pm 3.5	31.4 \pm 4.5	≥ 0.05

Literales ^{a-b} muestran diferencias significativas en hileras a $p \leq 0.05$. (Media \pm EE) teniendo en cuenta una n en MIV=2,204 ovocitos, DIV n=2,204 ovocitos y embriones y blastocistos n=1,100 embriones.

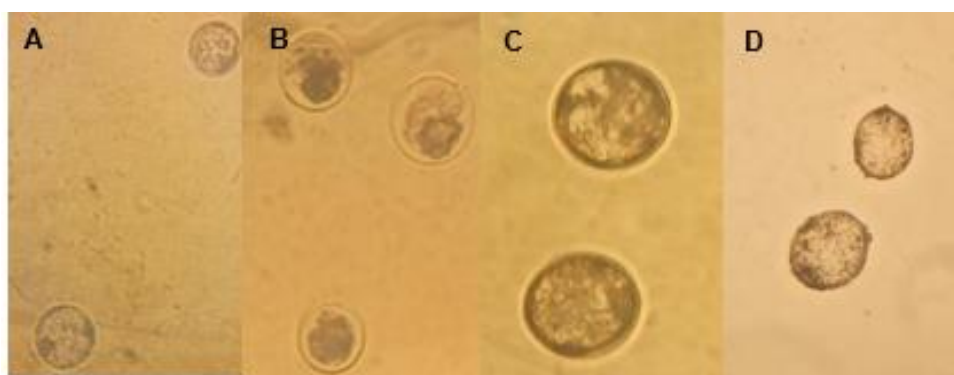
La tasa de DIV fue diferente estadísticamente entre el grupo tratado con 1 μ M de resveratrol siendo mayor que el grupo control ($p \leq 0.05$). La tasa de blastocistos no mostró diferencias estadísticas entre grupos ($p \geq 0.05$); pero, sí se observó que a 0.25 μ M de resveratrol, ésta se reduce (Tabla 1), sin ser estadísticamente significativo.

En la tasa de producción de blastocistos tempranos (día 4 de DIV) no se obtuvieron diferencias estadísticas ($p \geq 0.05$) (Tabla 1).

11.3. VITRIFICACIÓN Y POST VITRIFICACIÓN

Los blastocistos tempranos obtenidos al día 5 de cultivo fueron vitrificados por 24 h, posteriormente fueron desvitrificados y nuevamente cultivados por 48 h más (para que cumplieran los 7 días de cultivo). Se evaluó su calidad con base en la capacidad de dar continuidad a su desarrollo en blastocistos tardíos o eclosionados, encontrándose que ésta fue similar en todos los grupos tratados ($p \geq 0.05$) (Figura 11 y Tabla 2). Sin embargo, a concentraciones de 0.5 y 1 μM de resveratrol, se evidenció una mayor tasa de producción de blastocistos tardíos.

Figura 11. Blastocistos a 48 h post vitrificación producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol.



A. 0 μM (blastocistos expandidos); B. 0.25 μM ; C. 0.5 μM (blastocistos expandidos); D. 1 μM (blastocistos eclosionados). A; B; D: Aumento 10 X. C. Aumento 20 X.

Tabla 2. Tasa de blastocistos a 48 h post vitrificación producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.

RESVERATROL	0 μM	0.25 μM	0.5 μM	1 μM
Media \pm EE	58 \pm 20.9	41 \pm 23.6	59 \pm 7.3	64 \pm 13.8

Se evaluó una n=62 blastocistos.

11.4. NIVELES DE ERO Y GSH EN EMBRIONES POST VITRIFICACIÓN

La evaluación cualitativa de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), no mostró diferencias en los blastocistos de los grupos tratados con resveratrol (Figura 12). Sin embargo, la evaluación semi cuantitativa (Image J) determinó que los niveles de ERO se reducen con los diferentes tratamientos (0.25, 0.5 y 1 μM), particularmente con 0.5 μM ($p \leq 0.05$) (Tabla 3).

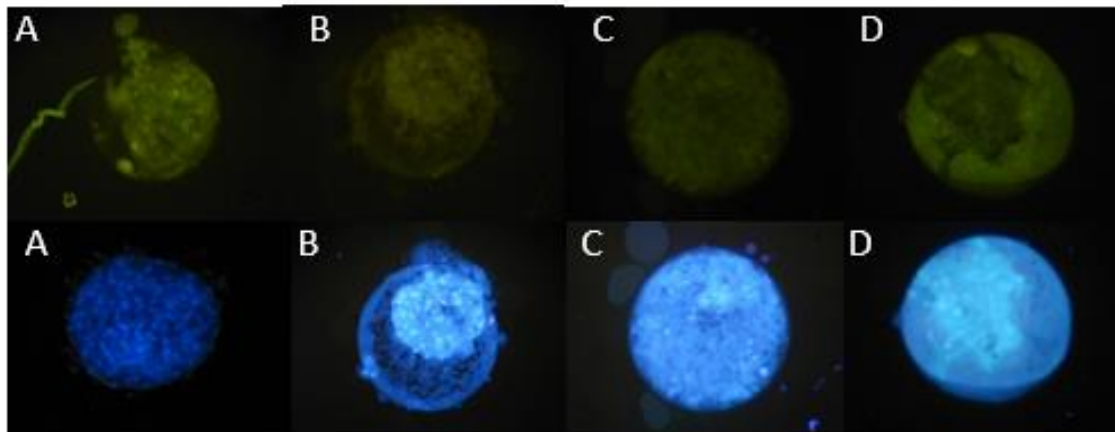
Tabla 3. Niveles de ERO y GSH (unidades de intensidad de fluorescencia) en blastocistos a 48 h post vitrificación, producidos a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.

REVERATROL	0 μ M	0.25 μ M	0.5 μ M	1 μ M
ERO (Media \pm EE)	34,722 \pm 768.4 ^a	22,229 \pm 4,314.2 ^{bc}	12,929 \pm 1,789.3 ^b	24,447 \pm 1,104.8 ^c
GSH (Media \pm EE)	25,733 \pm 9,637 ^a	60,478 \pm 10,586 ^b	94,446 \pm 9,589 ^b	74,759 \pm 14,800 ^{ab}

Literales ^{a-b-c-d}: $p \leq 0.05$ en hileras. Se tuvo en cuenta una $n=20$ blastocistos.

La evaluación cualitativa de GSH, mostró la presencia de esta enzima en todos los grupos tratados con resveratrol (Figura 12). Mientras que la evaluación semi cuantitativa mostró diferencias en los niveles entre 0.25 y 0.5 μ M con respecto al grupo control, siendo mayores a 0.5 μ M ($p \leq 0.05$) (Tabla 3).

Figura 12. Presencia de ERO (verde) y GSH (azul) en blastocistos a 48 h post vitrificación, producidos a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.



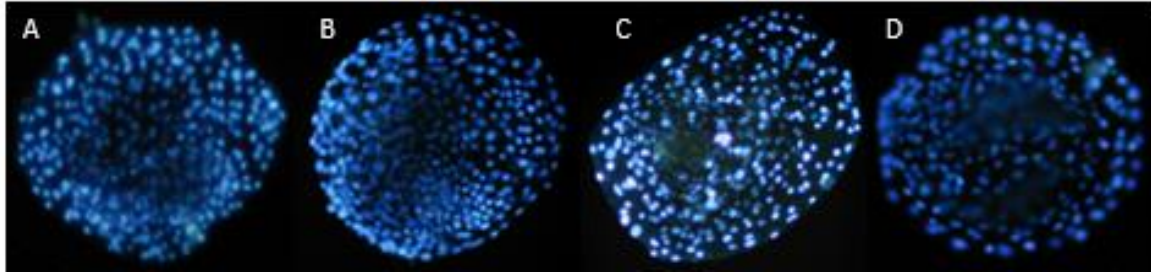
A. 0 μ M; B: 0.25 μ M; C: 0.5 μ M y D: 1 μ M. Tinción DCF (ERO) y Cell Tracker Blue® (GSH). Microscopio de epifluorescencia (Filtro UV de 460 y 405nm). Aumento 10 X.

Se observa que, conforme aumentan los niveles de GSH disminuyen los niveles de ERO.

11.5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD EMBRIONARIA NO VITRIFICADOS Y POST VITRIFICACIÓN

La cuantificación de núcleos en los blastocistos al día 7 de cultivo (no vitrificados), mostró diferencias significativas entre tratamientos, particularmente para 0.5 y 1 μ M de resveratrol, con respecto al grupo control ($p \leq 0.05$). Se observaron diferencias significativas entre 0.25 vs. 0.5 μ M y entre 0.5 vs. 1 μ M ($p \leq 0.05$), siendo 1 μ M el tratamiento con mayor número de núcleos, no así para 0.5 μ M de resveratrol (Figura 13 y Tabla 4).

Figura 13. Presencia de núcleos en blastocistos de *O. aries* previo a la vitrificación, producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV



(A. 0 μM ; B. 0.25 μM ; C. 0.5 μM y D. 1 μM). Tinción DAPI. Microscopio de epifluorescencia (Filtro UV de 405 nm). Aumento 20 X. Fuente: *Archivo personal 2022*.

Tabla 4. Número de núcleos presentes en blastocistos de *O. aries* producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.

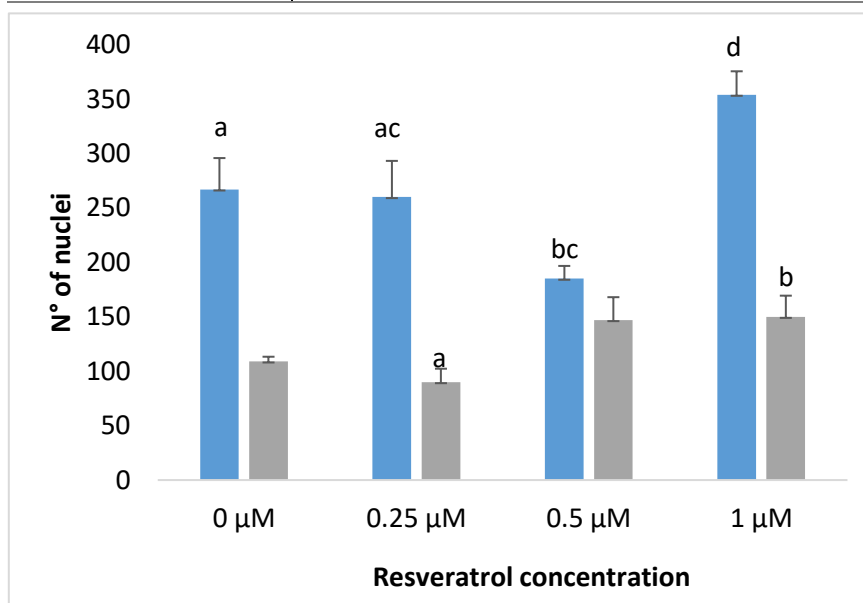
RESVERATROL	0 μM	0.25 μM	0.5 μM	1 μM
Media \pm EE	267 \pm 28.8 ^a	260 \pm 33.2 ^{ac}	185 \pm 11.7 ^{bc}	354 \pm 21.5 ^d

Literales ^{a-b-c-d}: $p \leq 0.05$. Día 7 de cultivo (no vitrificados). (n=40).

A las 48 h post vitrificación (día 7 de cultivo), la cuantificación de núcleos en los blastocistos mostró diferencias significativas entre 0.25 y 1 μM de resveratrol ($p \leq 0.05$), siendo mayor el número de núcleos a 1 μM (Tabla 5 y Figura 14). Sin embargo, en todos los grupos tratados el número de núcleos presentes en los embriones post vitrificación fue menor al de los embriones no vitrificados.

Tabla 5. Número de núcleos presentes en blastocistos de *O. aries*, producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV.

RESVERATROL	0 μM	0.25 μM	0.5 μM	1 μM
Media \pm DE	109 \pm 4.3	90 \pm 12.3 ^a	147 \pm 21	150 \pm 19.4 ^b



Literales ^{a-b}: $p \leq 0.05$. A las 48 h post vitrificación (día 7 de cultivo) (n=32).

Figura 14. Número de núcleos presentes (tinción DAPI) en blastocistos de *O. aries*, producidos por FIV a partir de ovocitos tratados con resveratrol durante la MIV. Sin vitrificar (azul) y post vitrificación (gris). Literales diferentes muestran diferencias significativas a $p \leq 0.05$.

12. DISCUSIÓN

12.1. Efecto del resveratrol en la MIV

La MIV de ovocitos, es el primer paso que define el éxito en la producción *in vitro* de embriones. Diversos factores propios del ovocito, como son la calidad de estos y la maduración, influyen sobre el éxito en la FIV y el posterior desarrollo embrionario. Otros factores denominados externos, como son los medios de cultivo, las variaciones en la temperatura, la concentración de CO₂ y la humedad durante el cultivo; así como la manipulación y los métodos de crioconservación, influyen sobre la viabilidad, la calidad embrionaria y el estrés oxidante (Guerin, 2001; Méndez *et al.*, 2020). Todos estos sucesos afectan el citoplasma y las membranas celulares, lo que ocasiona cambios en los ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Miclea *et al.*, 2012; Sollecito *et al.*, 2019).

En los sistemas *in vitro*, el estrés oxidante ocasionado por las ERO, daña a los ovocitos y embriones, ya que induce modificaciones a nivel mitocondrial, generando mayor apoptosis, disminución del ATP y bloqueo en el desarrollo embrionario (Guerin *et al.*, 2001). A diferencia de lo que ocurre *in vivo*, donde, en el caso de los ovocitos, están protegidos de estos efectos por los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos presentes en el líquido folicular (Combelles *et al.*, 2009). Es por esto por lo que los medios de cultivo han buscado la adición de antioxidantes de fuentes naturales y químicas (Asiye *et al.*, 2018) como: el α -tocoferol, las vitaminas, proteínas, enzimas antioxidantes, compuestos tiólicos, quelantes de metales, vitamina E y sus derivados, cisteamina, ácido ascórbico y extractos de plantas con propiedades antioxidantes (Ileana *et al.*, 2012; Asiye *et al.*, 2018). En el metabolismo normal de las células, las ERO son esenciales para el funcionamiento de las señales celulares, las funciones de los gametos y su crecimiento (Sunderam *et al.*, 2015; Lees *et al.*, 2017). Es por ello por lo que, en este proyecto se buscó mantener bajos los niveles de ERO durante la producción de embriones *in vitro* de *O. aries*, aunque no se midieron los niveles de ERO en los ovocitos madurados *in vitro* tratados con resveratrol.

Pese a ello, en los sistemas *in vitro* se han logrado establecer tasas de MIV de ovocitos mayores al 60% (Al Mutary *et al.*, 2019). Datos similares a los obtenidos en el presente estudio, con tasas de MIV de 81% en ovocitos tratados con 0.5 y 1 μ M de resveratrol, con respecto al grupo control (75%). Por lo tanto, la adición de este antioxidante en el medio de maduración aumenta las tasas de MIV al favorecer la maduración citoplasmática y nuclear del ovocito. Este efecto podría estar directamente relacionado por su capacidad de aumentar la expresión y la translocación nuclear de genes, principalmente los relacionados con evitar el estrés oxidante en el ovocito (Martínez *et al.*, 2019).

El resveratrol se ha utilizado en diferentes especies durante la MIV de ovocitos: porcinos, bovinos, ovinos y caprinos, reportándose que aumenta la concentración de glutatión reducido dentro del ovocito, disminuyendo la producción de ERO y aumentando la tasa de blastocistos. Además, su uso durante el cultivo *in vitro* de embriones ha generado un efecto positivo en el DIV y un aumento en la criotolerancia de blastocistos (Giarietta *et al.*, 2013; Salzano *et al.*, 2014).

12.2. Efecto del resveratrol en el DIV y tasa de blastocistos

Se ha reportado que la adición de resveratrol a 0.25 y 0.5 μM en el medio de MIV, aumenta la segmentación y la tasa de blastocistos (Kwak *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2014; Abbasi *et al.*, 2021). Datos similares a los aquí obtenidos, en donde las mayores tasas de segmentación embrionaria y de blastocistos se evidenciaron a concentraciones de 0.5 y 1 μM de resveratrol (68.6 y 69.2%). Como se mencionó anteriormente, aunque las ERO están directamente relacionadas con la función y crecimiento de los gametos, en este caso relacionado con el desarrollo embrionario, se sabe que el estrés oxidante promueve la apoptosis generando muerte embrionaria.

Durante el cultivo embrionario *in vitro* se mantienen condiciones ajenas a las naturalmente ocurridas en los procesos *in vivo*. Además, debido a que, conforme el embrión avanza en su desarrollo a la vez aumenta el metabolismo celular, las células son más susceptibles de presentar estrés oxidante. Específicamente la cadena respiratoria mitocondrial es susceptible de generar estrés oxidante. Los complejos I y II producen radicales superóxido y nitrilo, estos afectan las proteínas mitocondriales y alteran la función de diferentes enzimas metabólicas en la cadena transportadora de electrones (Selivanov *et al.*, 2011). A su vez, desde hace varios años se ha demostrado que el ADN mitocondrial (mtDNA) es más sensible al estrés oxidante que el ADN nuclear (Yakes y Van, 1997), posiblemente porque el mtDNA carece de histonas, las cuales lo protegen contra el daño de los radicales libres. Además, no cuenta con un sistema de reparación eficiente y está localizado cerca de la membrana mitocondrial interna, sitio de mayor producción de ERO (Finkel *et al.*, 2000; Chinnery *et al.*, 2012). Adicionalmente, el daño oxidativo en el mtADN puede inducir mutaciones y alterar la función e integridad mitocondrial (Han *et al.*, 2013). Esto en humanos, da lugar a enfermedades mitocondriales degenerativas tales como el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis amiotrófica lateral (Gou *et al.*, 2013; Kirkinezos *et al.*, 2019).

La acción antioxidante del resveratrol aumenta la concentración del GSH intracelular, el cual favorece las concentraciones de la enzima glutatión peroxidasa, fundamental para el equilibrio oxidante embrionario (Mukherjee *et al.*, 2014). Estas enzimas son parte de la barrera que se encuentra en los diferentes fluidos de la hembra. El GSH es el principal componente sulfhídrico no proteico en las células de mamíferos y es reconocido por proteger la célula del daño oxidante, regulando el

balance redox intracelular (Battin y Brumaghim, 2009). Sin embargo, varios estudios han sugerido que el GSH puede jugar además un papel importante en muchos procesos biológicos incluyendo la síntesis de ADN y proteínas, y proliferación celular durante el desarrollo embrionario (De Matos *et al.*, 2002). En bovinos, ha sido considerado un importante marcador de la viabilidad y la calidad de ovocitos de mamíferos (Zuelke *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha reportado la síntesis de GSH durante la maduración *in vitro* (Miyamura *et al.*, 1995; De Matos *et al.*, 1996), y su asociación con la formación del pronúcleo masculino después de la fecundación (Miyamura *et al.*, 1995; De Matos *et al.*, 1997) y el desarrollo embrionario temprano (De Matos *et al.*, 2002).

12.3. Efecto del resveratrol en la presencia de ERO

Basado en los datos obtenidos en la presente tesis, se evidencia que el resveratrol, al reducir el estrés oxidante, mejora la segmentación embrionaria temprana. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son producidas de manera natural durante el metabolismo celular (Tongyu *et al.*, 2021). Sin embargo, durante el desarrollo embrionario, especialmente en el paso de mórula a blastocisto temprano, se produce un aumento de éstas y, por consiguiente, en esta etapa el blastocisto es muy susceptible a presentar estrés oxidante. Éste se da cuando los antioxidantes endógenos (enzimáticos y no enzimáticos) no equilibran la cantidad de radicales libres que se están generando. Es por ello por lo que surge la necesidad de la adición de antioxidantes en los medios de cultivo (Mukherjee *et al.*, 2014).

Las ERO producidas de manera endógena y exógena durante el DIV de embriones, pueden inducir cambios epigenéticos. Las condiciones de cultivo que incluyen cambios en el pH, osmolaridad, temperatura, exposición a la luz visible, concentración de oxígeno y centrifugación de las células, pueden afectar el patrón epigenético durante el proceso *in vitro*, afectando la calidad de los gametos y embriones (Urrego *et al.*, 2014). Se ha sugerido que, en los gametos, el estrés oxidativo puede producir alteraciones en los patrones de metilación del ADN y modificación de las proteínas de histonas, cambios transmisibles de gametos a embriones, generando variaciones en el epigenoma. Ello genera alteraciones durante el DIV ocasionando la muerte embrionaria (Brykczynska *et al.*, 2010; De Castro *et al.*, 2016).

En la presente investigación, durante la producción *in vitro* de embriones de *O. aries*, dadas las condiciones ambientales y de manipulación ya mencionadas, los embriones estuvieron sujetos a estrés oxidante, lo que pudo afectar las tasas de MIV, DIV y producción de blastocistos, provocando que fueran bajas en comparación con las reportadas en la literatura *in vivo* para la especie estudiada (Mukherjee *et al.*, 2014; Zabihi *et al.*, 2021). Esto pudo resultar en una elevación en los niveles de ERO, causando muerte celular en las diferentes etapas del desarrollo embrionario evaluadas.

Por otro lado, siendo la vitrificación una tecnología que genera estrés oxidante, en esta tesis se pudo comprobar que el resveratrol reduce los niveles de ERO en los embriones posterior a su vitrificación, lo cual se vio reflejado en la capacidad de desarrollo embrionario post vitrificación (64% a 1 μ M de resveratrol), relacionado directamente con la supervivencia embrionaria que se determinó en el estudio.

12.4. Efecto del resveratrol en el estrés oxidante

Durante el desarrollo embrionario, el GSH puede jugar un papel importante en muchos procesos biológicos, incluyendo la síntesis de ADN y proteínas, y la proliferación celular (Zuelke *et al.*, 2003). Por lo que resulta importante determinar los niveles de éste en embriones producidos *in vitro*. En bovinos, se ha considerado un importante marcador bioquímico de la viabilidad y la calidad de los ovocitos (De Matos *et al.*, 1997; 2002). Por lo tanto, también es un indicador de la calidad embrionaria, ya que, además, se ha reportado su síntesis no sólo durante la MIV, sino también durante el DIV (Miyaruma *et al.*, 1995).

En el presente estudio se observó que, en los blastocistos post vitrificados, los niveles de GSH aumentaron conforme disminuían las dosis del resveratrol, teniendo un efecto inversamente proporcional a la presencia de ERO. Ello demuestra que durante la producción *in vitro* de embriones de *O. aries*, el resveratrol reduce el estrés oxidante al favorecer la presencia de antioxidantes endógenos como el GSH; por lo tanto, se podría relacionar con la calidad de estos.

12.5. Efecto del resveratrol en la crioconservación de embriones producidos *in vitro*

La crioconservación, específicamente por vitrificación, somete a las células a un estrés térmico importante, ya que los cambios de temperatura son muy radicales y rápidos. Otro de los inconvenientes es la formación de cristales de hielo intracelulares, los cuales ocasionan daños físicos y la muerte celular o embrionaria. Para contrarrestar estos efectos, se adicionan crioprotectores en los medios, cuya función es proteger la célula. En la vitrificación, se utilizan altas concentraciones del crioprotector, para deshidratar la célula sin que se formen los cristales intracelulares y así poder congelarla de manera inmediata en nitrógeno líquido (a -196°C) (Zhen *et al.*, 2020).

En la presente investigación, se utilizó el etilenglicol como crioprotector, ya que se ha reportado su eficiencia en la vitrificación de embriones ovinos y bovinos (Vajta, 2000; Vargas, 2013). Tiene propiedades, como son: la alta velocidad de penetración y la baja toxicidad, además de que evita tener que lavar los embriones para retirar el crioprotector, previo a la transferencia embrionaria, es decir que, no interfiere con la implantación embrionaria en las hembras receptoras de los embriones, al no ser retirado (Youngs, 2011).

Respecto a la tasa de supervivencia embrionaria post vitrificación, en este trabajo se obtuvo una tasa de 64% (1 μ M), siendo una tasa menor a la reportada en la literatura con el protocolo Open Pulled Straw (OPS) (72.6%) (Mendoza, 2020). Este efecto podría estar relacionado con el posible estrés oxidante que presentaron los embriones por las condiciones ambientales, de medios de cultivo y manipulación, ya que la crioconservación es un proceso que disminuye altamente la calidad de los gametos en general, en este caso de los embriones.

A pesar de la constante presencia de ERO observada en los diferentes tratamientos, ocurre una reducción en sus niveles con un aumento en los niveles de GSH y una mayor supervivencia embrionaria post vitrificación, particularmente a concentraciones de 0.5 μ M y 1 μ M de resveratrol, en embriones de ovino producidos por FIV cuyos ovocitos fueron sujetos durante la MIV, a los diferentes tratamientos de resveratrol.

12.6. Efecto del resveratrol en la calidad de embriones producidos *in vitro*

El número de núcleos en diferentes etapas del desarrollo embrionario se ha reportado como un determinante de la buena o mala calidad de este; dicho parámetro se puede mediar a partir de diferentes tinciones, las más comunes Hoechst y DAPI. El número de núcleos también va a depender de la etapa de desarrollo en la que se encuentre o el origen de estos Hernández *et al*, 2020 reportó promedios de 44.2 \pm 9.9 en embriones partenogenéticos de *O. aries* y 46.7 \pm 8.1 en embriones clones interespecie de *O. aries* y *O. canadensis mexicano*. Lorenzo *et al*, 2021 reportó un valor de 122 núcleos como embriones considerados de buena calidad, siendo este un valor por debajo del promedio mínimo (185 \pm 11.7) alcanzado en cada uno de los tratamientos realizados en el presente estudio. Datos similares se han reportado en otros estudios (Agata *et al.*, 2021; Mastrococco *et al.*, 2021; Nadri *et al.*, 2022). Sin embargo; sigue siendo la evaluación morfológica el principal método para la determinación de la calidad embrionaria en todas las especies a partir de las 3 clasificaciones globales que existen (Grado 1, 2 y 3) (ASEBIR, 2015).

El grupo con mayor conteo de núcleos fue los embriones obtenidos con ovocitos tratados con resveratrol a 1 μ M (354 \pm 21.5), considerándose estos como los de mejor calidad incluso post vitrificación, a pesar de que a esta concentración no se obtuvo la mayor tasa de producción de blastocistos, cabe resaltar que sí los blastocistos producidos eran de mejor calidad respecto a los blastocistos de los otros grupos experimentales y el control. El resveratrol favorece la replicación de ADN, además, favorece la expresión de algunos genes asociados a procesos de apoptosis, muerte embrionaria, maduración *in vitro*, etc. Siendo probablemente esta la razón de que los embriones de este grupo fuesen de mejor calidad debido a que se favoreció el proceso de división celular y protección a estrés oxidante post vitrificación (Dalle, 2003; Blanco, 2012).

13. CONCLUSIONES

- La tasa de MIV de ovocitos de *Ovis aries* mejora a concentraciones de 1 μM ; mientras que, a concentraciones de 0.25 μM disminuye significativamente.
- La producción de blastocistos por FIV se ve favorecida por la adición de resveratrol a 0.5 y 1 μM , además de que favorece la segmentación embrionaria para la obtención de blastocistos tempranos al cuarto día de DIV.
- El resveratrol durante la MIV favorece la tasa de supervivencia embrionaria post vitrificación, alcanzando un 64% a 1 μM y 59% a 0.5 μM .
- 0.25 μM de resveratrol durante la MIV ejerce un efecto negativo en la MIV, DIV, tasa de producción de blastocistos y tasa de supervivencia embrionaria post vitrificación.
- El resveratrol influye en la presencia de ERO, teniendo un efecto inversamente proporcional a la presencia de GSH a medida que aumenta la concentración de éste.
- La calidad embrionaria medida por la cantidad de núcleos fue mayor pre y post vitrificación a una concentración de 1 μM .

14. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, B., Dong, Y., & Rui, R. (2021) Resveratrol Hinders Postovulatory Aging by Modulating Oxidative Stress in Porcine Oocytes. *Molecules*. Oct 20;26(21):6346. doi: 10.3390/molecules26216346. PMID: 34770755; PMCID: PMC8588440.
- Agata, A.D., Palazzese, L., Czernik, M., Sabatucci, A., Valbonetti, L., Capra, E., & Loi, P. (2021) Controlled spermatozoa–oocyte interaction improves embryo quality in sheep. *Scientific Reports* 11:22629. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02000-z>
- Agustín S.M. (2012). Uso de la combinación de melatonina y prostaglandinas para la sincronización del estro en ovejas de raza rasa aragonesa. Tesis para obtener el título de Master en Iniciación a la Investigación en Ciencias Veterinarias. Universidad de Zaragoza. Tomado de <https://core.ac.uk/download/pdf/289972465.pdf>.
- Al-Mutary, M., Al-Ghadi, M., Al-Himaidi, A., Iwamoto, D., Al-Anazi, Y., Ammari, A., Ahmad, J., Al-Khedhairi, A. (2019) Using RT-PCR and glutathione level to study the effect of follicular fluid on *in vitro* maturation and gene expression of sheep oocytes. *Saudi J Biol Sci*. Sep; 26(6):1216-1222. doi: 10.1016/j.sjbs.2018.01.001. Epub 2018 Jan 31. PMID: 31516351; PMCID: PMC6733311.
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*. 3: 13-22.
- Arroyo, J., Magaña, H., Camacho, M.A. (2009). Regulación neuroendocrina del anestro posparto en la oveja. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10: 301-312.
- ASEBIR. (2015) Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción. Vol. 20 N° 1. Sesión de Embriología.
- Asiye, I.S., Ozen, B.O., Alper, B. (2018). Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos: efectos beneficiosos de la cisteamina. *J Dairy Vet Anim Res* 7: 64–65
- Barakat, I. A. H., Alajmi, R. A., Zoheir, K. M. A., Salem, L. M., & Al-Hemidiy, A. R. (2018). Gene expression and maturation evaluation of sheep oocytes cultured in medium supplemented with natural antioxidant source. *South African Journal of Animal Science*, 48(2), 261-270.
- Barrell, G.K., Moenter, M.S., Caraty, A., Karsch, J.F. (1992). Seasonal changes of gonadotropin – releasing hormone secretion in the ewe. *Biology of Reproduction*. 46: 1130-1135.
- Bartlewski, M.P., Vanderpol, J., Beard, P.A., Cook, J.S., Rawlings, C.N. (2000). Ovarian antral follicular dynamics and their associations with peripheral concentrations of gonadotropins and ovarian steroids in

anoestrous Finnish Landrace ewes. *Animal Reproduction Science*. 58: 273-291.

- Battin, E.E., Brumaghim, J.L. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys*55(1): 1–23.
- Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J, Roloff, T.C (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol*;17(6):679–687.
- Carvajal C.C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100. Retrieved January 26, 2021, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es.
- Chinnery, P.F, Elliott, H.R, Hudson, G., Samuels, D.C, Relton, C.L. (2012). Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol*;41(1): 177–187.
- Combelles, C.M., Gupta, S., Agarwal, A. (2009). ¿Podría el estrés oxidativo influir en la maduración *in vitro* de los ovocitos? *Reprod BioMed en línea* 18: 864–880
- Cuadrado, S.F. (2012) Evaluación de Ovocitos Ovinos por Microscopia de Luz Polarizada. Tesis para obtener título de Master Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción. Universidad de Oviedo.
- De Castro, L.S., De Assis, P.M, Siqueira, A.F.P., Hamilton, T.R.S., Mendes, C.M., Losano, J.D.A. (2016) Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dosedependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxid Med Cell Longe*:1–12.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F. (1997). Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod.*;57(6):1420– 1425.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Martínez, A.G., Matkovic, M. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev*45(4):451–457. 74.
- De Matos, D.G., Gasparrini, B., Pasqualini, S.R., Thompson, J.G. (2002). Effect of glutathione synthesis stimulation during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology.*;57(5): 1443– 1451.
- Escobar, E.J.C. (2021) Evaluación del efecto antioxidante del Resveratrol sobre la criotolerancia de embriones bovinos de la raza Hartón del Valle producidos *in vitro*. Tesis para obtener el título de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Tomado de

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80380/1114823584.2021.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

- Evans, A.C.O., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M.P. (2000). Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*. 53: 699-715.
- Evans, N.P., Richter, T.A., Skinner, D.C., Robinson, J.E. (2002). Neuroendocrine mechanisms underlying the effects of progesterone on the oestradiol induced GnRH/LH surge. *Reproduction Supplement*. 59: 57-66.
- FAO. (2019). Food Outlook- Biannual Report on global Food Markets. En Global information and early warning system on food and agriculture. <https://doi.org/10.1044/leader.PPL.19102014.18>
- Fernández R.F., Hernández P.J.E, & Pichardo Cruz, A.I. (2007). Maduración *in vitro* de ovocitos de ovino usando concentraciones de FSH+LH y FSH en medio de cultivo. *Revista de Salud Animal*, 29(2), 105-110. Recuperado en 07 de septiembre de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2007000200007&lng=es&tlng=es.
- Fernández, R.F., Hernández, P.J.E., Reyes, F.M. del C. (2010). Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal*, 32(2), 78-83. Recuperado en 07 de septiembre de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2010000200002&lng=es&tlng=es.
- Filipiak, Y.; Larocca, C. y Martínez, M. (2017) Comportamiento del Semen Bovino Sexado Congelado-Descongelado en Fertilización *in vitro* (FIV) Capacitado Mediante BO en dos Concentraciones versus Percoll. . *Int. J. Morphol.*, 35(4):1337-1341.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*;9;408(6809): 239–247.
- Florman, H., Ducibella, T. (2006). Fertilization in Mammals. *The Physiology of Reproduction*, Knobil and Neill. Edited by Neill, J., Third edition. Elsevier. Academic Press, USA. 2: 56-75.
- Forcada, F., Casao, A., Abecia, J. (2009). Producción *in vivo* de embriones ovinos. Trabajo presentado en el segundo congreso internacional de ciencias veterinarias. Puebla, México. [en línea], Consultado: Mayo 9, 2012 <http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/24-embriones.pdf
- Gambini, J., López, G.R., Olaso, G.G., Inglés, M., Abdelazid, K., El, A.M., Bonet, C.V., Borrás, C., Viña, J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. Volume 48, Issue 2, Pages 79-88. ScienceDirect. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2012.04.007>

- García, O., Maroto, A., Martínez, F., Fernández, M., Esteso, M., Pérez, M., Soler, A. 2009. Heterologous *in vitro* fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 71: 643-650
- García-Díaz, J.R, Romero-Aguirre; Gomez Corta, J, Astiz Blanco, S, & Ruiz López, S. (2013). Adición de sustancias antioxidantes en los medios de cultivo empleados en la producción *in vitro* de embriones en mamíferos. *Revista de Salud Animal*, 35(1), 10-19. Recuperado en 06 de septiembre de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2013000100002&lng=es&tlnq=es.
- García-García, R.M, González-Bulnes, A., Domínguez, V., Veiga-López, A., Cocero, M.J. (2006). Supervivencia de embriones de oveja congelados y descongelados crioconservados en etapas de escisión. *Criobiología*, 52:108-113.
- Giaretta, E., Spinaci, M., Bucci, D., Tamanini, C., Galeati, G. (2013). Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxid Med Cell Longevity*. Volumen 2013. doi: [10.1155/2013/920257](https://doi.org/10.1155/2013/920257)
- Gibbons A. & Cueto M. (2013) Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos. Segunda edición. Tomado de: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/28-MANUAL.pdf
- Gibbons A; Cueto M.I.; Pereyra Bonnet F (2011). A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Ruminant Research*, Volume 95, Issue 1, Pages 61-64, ISSN 0921-4488, <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.08.007>.
- Gibbons, A., Bruno G., Fernández, M., Gonzalez-Bulnes J.A, & Cueto, M. (2019). Vitrified embryo transfer in Merino sheep under extensive conditions. *Animal Reproduction*, 16(2), 297-301. Epub November 25, 2019. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2018-0108>
- Giraldo, G.J.J. (2011). Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*. Tesis para obtener el título de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- González, M.D.F. (2020). Efecto del protocolo de vitrificación y sistemas de empaque sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos obtenidos *in vivo*. Tesis para obtener el título de maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Goodman, R.L., Gibson, M., Skinner, D.C., Lehman, M.N. (2002). Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from ewe. *Reproduction Supplement*. 59: 41-56.
- Guerin P., Mouatassim S, Menezo Y. (2001). Oxidative stress and protection against reaction oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Reprod Updat*;7(2): 175-189.
- Gumbao, B.D. (2015) Efecto antioxidante del glutati6n aplicado en el medio de descongelaci6n seminal de tres especies con inter6s pecuario. Tesis.

Universidad de Murcia. Tomado de <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/47649/1/TESIS%202015%20UNIVERSIDAD.pdf>

- Hafez, E.S. (1996). Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial Interamericana McGraw Hill. D.F., México. pp. 186-189.
- Han Y, Chen JZ. (2013). Oxidative stress induces mitochondrial DNA damage and cytotoxicity through independent mechanisms in human cancer cells. *Biomed Res Int*;2013:1–8.
- Hernández, M.S., Hernández, P.J.E., Vazquez, A.J.R., Ambríz, G.D.A. & Navarro, M.M.C. (2020) Developmental dynamics of cloned Mexican bighorn sheep embryos using morphological quality standards. *Vet Med Sci.* 2020; 6:382–392. DOI: 10.1002/vms3.242.
- Holm P, Callesen H. In vivo versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev* 1998; 38: 579-594. Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Aoki F, Tojo H, Toyoda Y. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2000; 63: 715–722.
- Hussein, S.A., Abdel, M.A.D. & Elwahab, F.F.A. (2017) Biochemical effect of resveratrol on Lipids profile and hepatic oxidative stress in experimentally induced obesity in female rats. *Benha Veterinary Medical Journal*, Vol. 32, No. 1:67 – 74.
- Ileana, M.N-P-, Andrea. H., Marius, Z., Vasile, M. (2012). Alfa-tocoferol y Las combinaciones de ácido ascórbico influyen en la maduración de los ovocitos de oveja. *Anim Sci Biotechnol* 45: 310–313
- Itami, N., Shiratsuki, S., Shirasuna, K., Kuwayama, T., Iwata, H. (2015) Mitochondrial biogenesis and degradation are induced by CCCP treatment of porcine oocytes. *Reproduction*. 2015;150:97-104.
- Jackson, G.L., Kuehl, D. (2002). Gamma-aminobutyric acid (GABA) regulation of GnRH secretion in sheep. *Reproduction, Supplement*. 59: 15-24
- Joo, Y.Y., Sutovsky, P. (2011). Gamete binding and fusion. En *Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event*. Tosti, E. and Boni R. Eds. Bentham Books. Italy, pp. 93-103.
- Juárez, P.A., Domínguez, R.Á., Pinzón, L.L., Aguilar, U.E., Ortiz de la Rosa, B., Ramón, U.J.P. (2018) Embriones ovinos vitrificados mediante una técnica “One Step” producidos en dos estaciones. *Revista Agro productividad*. : Vol. 11, Núm. 10, pp: 121-126.
- Kaidi, S., Donnay, I., Lambert, P., Dessy, F., & Massip, A. (2000). Osmotic behavior of *in vitro* produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology* 41, 106–115.
- Kaidi, S., Van, L.A, Massip, A., Dessy, F., & Donnay, I. (1999) Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 52, 515–525.

- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Aoki F, Tojo H, Toyoda Y. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2000; 63: 715–722.
- Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12(6):449–457.
- Kwak, S.S., Cheong, S.A., Jeon, Y., Lee E., Choi, K.C., Jeung, E.B., (2012). The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Theriogenology.*; 78: 86–101. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.01.024.
- Lees, J.G., Gardner, D.K., Harvey, A.J. (2017). Metabolismo de células madre pluripotentes lismo y mitocondrias: más allá del ATP. *Stem Cells Int* 2017:1–18
- Magdanz, V., Boryshpolets, S., Ridzewski, C., Eckel, B., Reinhardt, K. (2019). The motility-based swim-up techniques separates bull sperm based on differences in metabolic rates and tail length. *PLoS One* 14: e0223576. doi: 10.1371/journal.pone.0223576
- Malpaux, B., Tricoire, H., Mailliet, F., Daveau, A., Migaud, M., Skinner, D.C., Pelletier, J., Chemineau, P. (2002). Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reproduction Supplement*. 59: 167-179.
- Malpaux, B., Viguié, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Chemineau, P. (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Research Bulletin*. 44: 431-438.
- Martínez, A.G., de Matos, D.G., Furnus, C.C., Brogliatti, G.M. (1998) *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 50, 757–767.
- Martínez, A.G., Valcarcel, A., de las Heras, M.A., de Matos, D.G., Furnus, C., Brogliatti, G. (2002) Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Anim Reprod Sci* 73, 11–21.
- Martínez, I.J., Espinoza, M.E., Rangel, S., Ambriz, G.D., Navarro, M.M. (2019). Effect of resveratrol on the *in vitro* maturation of ovine (*Ovis aries*) oocytes and the subsequent development of handmade cloned embryos. *Veterinaria México* OA, 5(4). <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2018.4.491>
- Martínez, M.A. (2016) Diversificación de la producción de estilbenos en cultivos celulares de vid mediante ingeniería metabólica. Tesis para obtener el grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alicante. Tomado de https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/73095/1/tesis_ascension_martinez_marquez.pdf
- Martínez, M.A., Morante, C.J.A., Ramírez, E.K., Cusidó, R.M., Palazon, J., Bru, M.R. (2016) Production of highly bioactive resveratrol analogues

pterostilbene and piceatannol in metabolically engineered grapevine cell cultures. *Plant Biotechnology Journal*. Volume14, Issue9. Pages 1813-1825. <https://doi.org/10.1111/pbi.12539>

- Mastroiocco, A.; Cacopardo, L.; Lamanna, D.; Temerario, L.; Brunetti, G.; Carluccio, A.; Robbe, D.; Dell'Aquila, M.E. Bioengineering Approaches to Improve *In Vitro* Performance of Prepubertal Lamb Oocytes. *Cells* 2021, 10, 1458. <https://doi.org/10.3390/cells10061458>
- Méndez, M.S., Argudo, D.E., Soria, M.E., Galarza, L.R., Perea, F.P. (2020). Efecto de la adición de melatonina en el medio de maduración y/o vitrificación de ovocitos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(1), e17557. Epub 31 de marzo de 2020. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17557>
- Miclea I.; Pacala N.; Hettig A.; Zahan M.; Miclea V (2012). Las combinaciones de alfa tocoferol y ácido ascórbico influyen en la maduración de los ovocitos de oveja. *Artículos científicos Ciencias animales y biotecnologías* 45:310–313
- Miyamura M, Yoshida M, Hamano S, Kuwayama M. (1995). Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology*;43(1):282. 73.
- Moore, H. (2001). Molecular biology of fertilization. *J. Reprod. Fertil. Supplement*, 57: 105-110
- Moro, M.A., Paraíso, B., Martínez, S.E., Barrenetxea, Z.G., P. Trolice, M., Barranquero, G.M. & Salvador Z. (2020) ¿Qué es la vitrificación? Cuándo y cómo se hace. *Revista virtual. Reproducción asistida ORG*. Tomado de <https://www.reproduccionasistida.org/congelacion-de-embriones/>
- Mukherjee, A., Malik, H., Saha, A.P., Dubey, A., Singhal, D.K., Boateng, S. (2014). Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Genet.*; 31:229–39. doi: 10.1007/s10815-013-0116-9.
- Muñoz, V.M.A. (2005). Fertilización *in vitro* en cerdos. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Posgrado en Biología Molecular. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. San Luis Potosí, SLP.México.
- Nadri P, Ansari-Mahyari S, Jafarpour F, Mahdavi AH, Tanhaei Vash N, Lachinani L, et al. (2022) Melatonin accelerates the developmental competence and telomere elongation in ovine SCNT embryos. *PLoS ONE* 17(7): e0267598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267598>
- Navarro, L.B. (2019). Efecto de la vitrificación embrionaria sobre el número de mitocondrias en embriones preimplantacionales y en tejido hepático en conejo. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia.

- Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y, 2000: Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology* 53, 1439– 1448.
- O'Brien, J.K.; Dwarte, D.; Ryan, J.P.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. (1996): Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod. Fertil. Devel.* 8: 1029-1037.
- Palacios, G.B., Zarain, A.H., Flores, G.I., G. N.L., Alemán, E.G., Zariñan, T., Ulloa A.A., Torres, N., Tovar R.A. (2014). Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. ELSEVIER. Volume 1841, Issue 1, Pages 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.08.018>
- Palasz, A.T. & Mapletoft, R.J. (1996) Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.*, 14:127-149.
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS, Lim JH, (1999) Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum Reprod* 14, 2838–2843.
- Parra, C.R.I.; Valderrama, .M.; Martínez, CG. (2021) Situación actual y perspectivas de la ganadería de bovinos Criollos en América Latina. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 2021. 29 (34). <http://www.doi.org/10.53588/alpa.293401>.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 145: 27-37.
- Rall, W.F., Fahy, G.M. 1985: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at 196°C by vitrification. *Nature* 313, 573–575.
- Ramírez, O. & Bernal, S. (2012). Vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2): 419-429. Retrieved January 30, 2021, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000200020&lng=en&tlng=es.
- Rodríguez, S.J.L., Romo, G.S.D., Casas, H.E. & Hernández, P.J. E. (2017). Desarrollo de mórulas de ovino en medio simple o secuencial: relación entre evaluación morfológica y viabilidad embrionaria. *Revista de Salud Animal*, 39(1), 9-18. Recuperado en 25 de enero de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2017000100002&lng=es&tlng=es.
- Rodríguez, Z.L.A. (2013) Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación *in vitro*. Tesis para obtener el título de doctor en Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. España.

- Rosa, D.E. (2015). Efecto del cobre durante la maduración de ovocitos bovinos: impacto sobre el desarrollo embrionario preimplantacional. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J. (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*. 48: 155-171.
- Saacke, R.G. (2003). Fertilidad del toro: una opinión sobre su estado actual y perspectivas. *Taurus*, Bs. As.5(19):18-28.
- Salgado, C.E. & Lopera, V.R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización *in vitro* en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3), e17138. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17138>
- Salzano, A., Albero, G., Zullo, G., Neglia, G., Abdel, W.A., Bifulco, G. et al. (2014). Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Anim Reprod Sci*; 151(3–4):91–96.
- Santa Cruz P, Carolina, Huanca L, Wilfredo, Condori P, Rosario, & Ampuero B, Antonio. (2014). Uso de Macromoléculas sobre la Tasa de Maduración y Desarrollo Embrionario *in vitro* de Ovocitos Bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4), 487-493. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10799>
- Selivanov, V.A., Votyakova, T.V., Pivtoraiko, V.N., Zeak, J., Sukhomlin, T. & Trucco, M. (2011). Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. Beard DA, editor. *PLoS Comput Biol* Mar 31;7(3):e1001115.
- Senger, P. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2ª Edition. Current Conceptions Inc. Pullman, Washington, USA. pp. 287-325
- Simonetti L. (2017) Simplificación de los métodos de súper ovulación en ovejas de la raza Corriedale. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sollecito, N.V., Pereira, E.C.M., Grázia, J.G.V., Neves, B.P., Couto, B.V.R., Andrade, V.B., Miranda, M.S., Silva, J.K.R., Borges, A.M, (2019), La actividad antioxidante del extracto oleoso obtenido de *Lippia origanoides* mejora la calidad de los embriones bovinos producidos *in vitro*. *Arq Bras Med Vet Zoo* 71: 723–731
- F. & Hansen P. J. (2019) Protocol for embryo vitrification using open pulled straws. *Procedures for In Vitro Production of Bovine Embryos - University of Florida*. Sosa
- Succu, S., Serra, E., Gadau, S., Varcasia, A., Berlinguer, F. Vitrification of In Vitro Matured Oocytes Collected from Adult and Prepubertal Ovaries in Sheep. *J. Vis. Exp.* (173), e62272, doi:10.3791/62272 (2021).
- Sunderam, S., Kissin, D.M., Crawford, S.B., Folger, S.G., Jamieson, D.J., Warner, L., Barfield, W.D. (2015). Vigilancia de la tecnología reproductiva asistida Estados Unidos, 2012. Informe semanal de morbilidad y mortalidad: resúmenes de vigilancia 64:1–29.

- Takahashi, M. (2012). Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. *J Reprod Dev*; 58(1):1-9.
- Takahashi, M., Keicho, K., Takahashi, H., Ogawa, H., Schultz, R.M., Okano, A. (2000). Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in-vitro* cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*; 54(1):137-145.
- Tarazona, A., López, A. & Olivera, M.A. (2010). La competencia del ovocito: qué, cómo y cuándo. *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 3-18. Tomado de: from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2010000300001&lng=en&tlng=es.
- Terreros, C., Marino, H.L., Wilfredo, A.C., Irma, & Ampuero, B.A. (2015). Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 420-426. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11182>
- Tibary, A., Anouassi, A., & Khatir, H. (2005). Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*, 64(3), 618-638. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.016
- Tongyu, G., Nianmin, W., Tong, W., Qi, G., & Liang, C. (2021) Antioxidative Stress Mechanisms behind Resveratrol: A Multidimensional Analysis. *Hindawi Journal of Food. Quality* Volume 2021, Article ID 5571733, 12 pages <https://doi.org/10.1155/2021/5571733>
- Torres, O.V., Urrego, R., Echeverri, Z.JJ., López, H.A. (2019). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción *in vitro* de embriones mamíferos. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(2): 433-459. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>
- Torres, R.F., Manjarrez, C.I., Carvajal, S.M., Grajales, L.H.A. (2019) Efecto de la adición de antioxidantes en los diluyentes para la preservación de semen ovino. *Rev Med Vet.* 2019;(38):101-109. <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss38.9>
- Torres, S.J.F.; Moreno, P.L.F. (2021) Recuperado de: <https://angusdemexico.com/produccion-de-embriones-mediante-una-tecnica-modificada-de-gift-una-nueva-alternativa-para-el-mejoramiento-genetico-en-bovinos/>.
- Tsafiriri, A., Dekel, N. (2011). Intra and intercellular molecular mechanisms in regulation of meiosis in murid rodents. En: *Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event*. Edited by Tosti, E. and Boni, R. Eds. Bentham Books, Italy. pp. 38-63.
- Urrego, R., Rodriguez, O.N. & Niemann H. (2014). Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. *Epigenetics*;9(6): 803–815.
- Vajta Gábor (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science* 60–61 2000 357–364.

- Varago, F. C., Moutacas, V. S., Carvalho, B. C., Serapião, R. V., Vieira, F., Chiarini-Garcia, H., Brandão, F. Z., Camargo, L. S., Henry, M., & Lagares, M. A. (2014). Comparison of conventional freezing and vitrification with dimethylformamide and ethylene glycol for cryopreservation of ovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(5), 839–844.
- Vargas, R.J.N. (2013). Efecto de las técnicas de congelación lenta y vitrificación con etilenglicol sobre la calidad poscriopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/10
- Venereo, G.J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133. Recuperado en 23 de junio de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009&lng=es&tlng=es.
- Viada, P., Gómez, R.E., Campaña, M.L. & Reyna, I. (2017). Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*, 21(1), 171-186. Recuperado en 23 de junio de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014&lng=es&tlng=es.
- Viana, J. (2019). Embryo Technology Newsletter. Embryo Tecnology Newsletter, v.36, n.4, 2019, 36(4).
- Wan, P., Hao, Z., Zhou, P., Wu, Y., Yang, L., Cul, M., Liu, S., Zeng, S. 2009. Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 114: 279-288.
- Watson, A.J., Barcroft, L.C. (2001) Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci.* May 1;6:D708-30. doi: 10.2741/watson. PMID: 11333210.
- Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF, Kruip TAM, 1994: Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology* 42, 1275–1284.
- Yakes, F.M., Van, H.B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;21;94(2):514–519.
- Youngs C. R. (2011) Cryopreservation of Preimplantation Embryos of Cattle, Sheep, and Goats. Doi: <https://dx.doi.org/10.3791/2764>
- Zabihi A., Karami Shabankareh H., Hajarian H., Foroutanifar S. (2021) *In vitro* maturation medium supplementation with resveratrol improves cumulus cell expansion and developmental competence of Sanjabi sheep oocytes. *ELSEVIER. Livestock Science* 243 - 104378. Doi <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.10437>
- Zhen, G., Ge, Y., Hui, Z., Haokun, L., Zhenshan, Y., Chen, L., Wei, L., Xiaoe, Z.M., Qiang, W., & Baohua M. (2020) Resveratrol protects the mitochondria

from vitrification injury in mouse 2-cell embryos . Cryobiology.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.05.007>

- Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. (2003). Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev*;64(1):106–112. 72.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00117

Matrícula: 2203801569

CALIDAD POST VITRIFICACIÓN
DE EMBRIONES OVINOS
ORIGINADOS DE OVOCITOS
TRATADOS CON RESVERATROL.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 6 del mes de julio del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA
DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS
DR. CESAR CORTEZ ROMERO
DR. JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: ANDREA CAROLINA GONZALEZ GARZON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR


Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Andrea Gonzalez


ANDREA CAROLINA GONZALEZ GARZON
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

VOCAL



DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

VOCAL



DR. CESAR CORTEZ ROMERO

SECRETARIO



DR. JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO