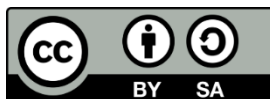




**Efecto de la ciclicidad ovárica de las hembras ovinas sobre la tasa de recuperación,
competencia ovocitaria y producción de embriones *in vitro***

Lina Marcela Triana Gelvez

ID 410308



Universidad Cooperativa de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Bucaramanga, Colombia

2021

**Efecto de la ciclicidad ovárica de las hembras ovinas sobre la tasa de recuperación,
competencia ovocitaria y producción de embriones *in vitro***

Lina Marcela Triana Gelvez

ID 410308

Trabajo de grado para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista

Director

Edgar Ricardo Moreno Jerez

Médico Veterinario, Esp y MSc en Reproducción animal

Universidad Cooperativa de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Bucaramanga, Colombia

2021

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

Bucaramanga, 2021

Dedicatoria

A DIOS por todas las bendiciones recibidas cada día y por la fortaleza que me dio para superar todos los altibajos que se presentaron y poder culminar este trabajo, por hacerme una mejor persona cada día.

A mis padres: JORGE Y ROMELIA por todo el apoyo que me brindaron durante todo el proceso, por nunca dejar de creer en mí y por inculcarme cada día los valores que me hacen ser cada día mejor.

A mi hermana: SARA por todo el ánimo que siempre me brindo y acompañamiento durante todo el proceso, por enseñarme que los sueños siempre se hacen realidad.

A mi FAMILIA Y AMIGOS, por siempre estar para mí.

Agradecimientos

Dr. EDGAR RICARDO MORENO JEREZ Médico Veterinario, Esp y MSc en Reproducción animal, director del proyecto por sus enseñanzas y acompañamiento durante este proyecto y etapa de vida. Por el apoyo recibido y la confianza brindada.

Dr. DIEGO FERNANDO DUBEIBE, por los importantes aportes brindados que contribuyeron a un mejor direccionamiento del proyecto.

Dr. MIGUEL ANGEL BEDOYA RIOS, por su acompañamiento, enseñanzas y aporte durante mi formación profesional y personal.

WENDY REMOLINA CASTRILLON, compañera de trabajo, por todo el apoyo y paciencia brindadas a lo largo de este proyecto.

Ing. SONIA ISABEL POLO TRIANA, por su apoyo incondicional en la estructuración de este trabajo.

Tabla de Contenido

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1. Planteamiento del Problema | 18 |
| 2. Justificación | 20 |
| 3. Objetivos | 22 |
| 3.1 Objetivo General | 22 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 22 |
| 4. Marco Teórico..... | 23 |
| 4.1 Etapas de la Producción <i>in vitro</i> de Embriones..... | 23 |
| 4.1.1 Maduración Ovocitaria. | 23 |
| 4.1.2 Preparación Espermática..... | 26 |
| 4.1.3 Fertilización <i>in vitro</i> | 28 |
| 4.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> | 29 |
| 4.2 Competencia ovocitaria..... | 30 |
| 4.2.1 Factores que afectan la competencia ovocitaria..... | 33 |
| 5. Materiales y métodos | 44 |
| 5.1 Recolección de ovarios..... | 44 |
| 5.2 Selección de los ovarios por tratamiento..... | 46 |
| 5.3 Grupos experimentales | 46 |
| 5.4 Recuperación y clasificación de los CCOs | 47 |

| | | |
|------|--|----|
| 5.5 | Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos..... | 48 |
| 5.6 | Fertilización <i>in vitro</i> | 48 |
| 5.7 | Cultivo <i>in vitro</i> | 51 |
| 5.8 | Evaluación de la tasa de clivaje y producción de blastocistos..... | 51 |
| 5.9 | Diseño experimental..... | 52 |
| 5.10 | Análisis estadístico..... | 52 |
| 6. | Resultados y Discusión..... | 54 |
| 6.1 | Recuperación y clasificación de ovarios y complejos <i>cúmulos</i> ovocitos..... | 54 |
| 6.2 | Fertilización <i>in vitro</i> y gradientes de PERCOLL..... | 55 |
| 7. | Conclusiones..... | 61 |
| 8. | Recomendaciones..... | 62 |
| 9. | Referencias Bibliográficas..... | 63 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Par de ovarios por hembra faenada. | 45 |
| Figura 2. Ovarios lavados y debridados..... | 45 |
| Figura 3. Solución buferada fosfatada (PBS) | 46 |
| Figura 4. Columnas de PERCOLL | 49 |

Lista de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Recuperación y clasificación de ovarios y complejos cúmulus ovocitos | 54 |
| Tabla 2. Porcentaje tasa de clivaje y blastocisto por grupo experimental | 59 |

Lista de abreviaciones y símbolos

BSA: Albumina sérica bovina.

CCOs: Complejos cumulus-ovocitos.

CIV: Cultivo *in vitro*.

CL: Cuerpo lúteo.

CL+: Ovario con cuerpo lúteo.

CL-: Ovario sin cuerpo lúteo.

FIV: fertilización *in vitro*.

FSH: Hormona folículo estimulante.

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

MIV: Maduración *in vitro*.

mL: Mililitro.

MI: Metafase I.

MII: Metafase II.

NaCl: Cloruro de sodio.

NCL: Ningún ovario con cuerpo lúteo.

PIV: Producción *in vitro*.

PIVE: producción *in vitro* de embriones

P4: Progesterona

SOF: Medio de fluido oviductual sintético.

TALP: Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato.

TCM-199: Medio de cultivo tisular.

µg: Microgramo.

µl: Microlitro.

RESUMEN

Este proyecto se realizó con el objetivo de evaluar la influencia de la ciclicidad ovárica en hembras ovinas sobre la tasa de recuperación y competencia ovocitaria y sobre la producción *in vitro* de embriones. Se obtuvieron pares de ovarios hembras ovinas provenientes de una planta de beneficio ubicada en la ciudad de Bucaramanga. Primeramente, fueron clasificados de acuerdo a la presencia de cuerpo lúteo (CL) en tres grupos de la siguiente manera: NCL (No Cuerpos Lúteos) o anovulatorios, Monovulatorios y poliovulatorios. Posteriormente, para establecer la influencia directa del CL, los ovarios se estratificaron en 5 subgrupos o tratamientos de la siguiente manera: NCL, M+, M-, P+ y P-. Luego, se procedió a recuperar los ovocitos por ovario por grupo experimental, y evaluar la calidad del ovocito. Posteriormente, los ovocitos clasificados como tipo I y tipo II se sometieron a maduración *in vitro* (MIV). La maduración de los CCOs se realizó en incubadora durante 22-24 horas, en gotas de 100 μ L de medio de maduración, cada una marcada con su grupo correspondiente, siendo recubiertas por aceite mineral (SIGMA) previamente filtrado. Una vez transcurrido el tiempo de maduración los ovocitos tipo I y tipo II fueron recuperados de los ovarios y se fertilizaron con espermatozoides de ovino durante 18-22 horas en FIV. Los posibles embriones fueron cultivados *in vitro* (CIV), estuvieron en cultivo durante 7 días. Se evaluó la tasa de clivaje a las 48 h del CIV y a los 8 días de cultivo se determinó la tasa de blastocistos. Se realizaron dos experimentos, el primero evaluó la tasa de Recuperación, calidad morfológica y competencia nuclear y citoplasmática de ovocitos y el segundo experimento evaluó efecto de la presencia del cuerpo lúteo, sobre la tasa de recuperación ovocitaria. Los resultados mostraron que el mayor porcentaje de ovocitos recuperados lo obtuvo el grupo P+ y M- y el menor porcentaje de ovocitos recuperados fueron los grupos NCL. En la tasa de clivaje se observó que de la misma forma el grupo que tuvo mayor porcentaje fue el P+. Se concluye que la ciclicidad ovárica causa un efecto sobre la competencia de desarrollo ovocitario, afectando también el porcentaje de clivaje y el desarrollo embrionario. Y el manejo de las células en cocultivo causan un efecto positivo sobre la producción de embriones *in vitro*.

Palabras clave: calidad morfológica de CCOs, estandarización del medio de fertilización, maduración ovocitaria, tasa clivaje.

Abstract

This project was carried out with the objective of evaluating the influence of ovarian cyclicity in ovine females on the recovery rate and oocyte competition and on the *in vitro* production of embryos. Pairs of ovine female ovaries were obtained from a processing plant located in the city of Bucaramanga. First, they were classified according to the presence of the corpus luteum (CL) into three groups as follows: NCL (No Corpus Luteum) or anovulatory, Monovulatory and poliovulatory. Subsequently, to establish the direct influence of CL, the ovaries were stratified into 5 subgroups or treatments as follows: NCL, M +, M-, P + and P-. Then, the oocytes were recovered per ovary per experimental group, and the quality of the oocyte was evaluated. Subsequently, the oocytes classified as type I and type II were subjected to *in vitro* maturation (IVM). The maturation of the CCOs was carried out in an incubator for 22-24 hours, in drops of 100 μ L of maturation medium, each one marked with its corresponding group, being covered by mineral oil (SIGMA) previously filtered. Once the maturation time had elapsed, type I and type II oocytes were retrieved from the ovaries and fertilized with ovine sperm for 18-22 hours in IVF. The probable embryos were cultured *in vitro* (CIV), they were in culture for 7 days. The cleavage rate was evaluated at 48 h after VSD and at 8 days of culture, the blastocyst rate was determined. Two experiments were carried out, the first one evaluated the recovery rate, morphological quality and nuclear and cytoplasmic competence of oocytes and the second experiment evaluated the effect of the presence of the corpus luteum on the oocyte recovery rate. The results showed that the highest percentage of recovered oocytes was obtained by the P + and M- group and the lowest percentage of recovered oocytes were the NCL groups. In the cleavage rate, it was observed that, in the same way, the group with the highest percentage was the P +. It is concluded that ovarian cyclicity causes an effect on oocyte development competence, also affecting the cleavage percentage and embryonic development. And the handling of cells in coculture causes a positive effect on the production of embryos *in vitro*.

Key words: morphological quality of CCOs, standardization of the fertilization medium, oocyte maturation, cleavage rate.

INTRODUCCIÓN

Los ovinos representan una alternativa eficiente para suplir diferentes requerimientos nutricionales en un menor tiempo, de ellos también pueden ser obtenidas materias primas para la generación de prendas de vestir de excelente calidad, productos cosméticos y otros subproductos. En el proceso productivo con esta especie, los requerimientos de terreno necesario son mucho menores que los utilizados normalmente en una ganadería bovina, por ende, se requiere de una menor inversión (1). Según datos reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la producción de ganado ovino en el mundo ha aumentado de 1244 millones en 2010 a 1373 millones de cabezas en 2018. (2)

Actualmente los ovinos representan una alternativa económicamente viable, especialmente para los países en desarrollo y una muy buena oportunidad para todo tipo de productor. Sin embargo, para que esto se cumpla, es importante optar por medidas eficientes que generen resultados significativos a la hora de seleccionar y conseguir mejores ejemplares de cada raza en cada tipo de producción y aprovechar este material genético. En este sentido, la producción *in vitro* de embriones (PIVE) como tecnología reproductiva disponible puede jugar un papel importante para acelerar la reproducción de ovejas con características genéticas superiores y de esa manera mejorar la eficiencia de la producción (3). Sin embargo, los resultados de producción *in vitro* de embriones en ovinos aún son bastante bajos, y para mejorarlos, se requiere un mejor conocimiento de las particularidades que presenta esta especie.

De acuerdo con los reportes generados por los países vinculados a la sociedad internacional de tecnología de embriones (IETS), en ovinos la producción de embriones *in vitro* es poco significativa con respecto a su producción *in vivo*, aun así, el informe del comité de recuperación de datos del 2018, mencionó que el incremento en la tendencia del uso de tecnologías en ovejas y la cantidad de embriones registrados *in vitro* a nivel mundial aumentó 675,8%, a pesar de que se detectó una pequeña reducción en el número de embriones producidos en ovejas (18.400 frente a 18.718 en 2017; -1,7%), el número de países que informaron datos sobre esta especie aumentó (14 frente a 9 en 2017). (4)

La producción eficiente de embriones es actualmente un objetivo importante para las industrias ganaderas, incluidos los pequeños rumiantes, pero la heterogeneidad de los ovocitos recolectados de los folículos en crecimiento aún limita la tasa de desarrollo embrionario. Además, la menor calidad de los embriones producidos *in vitro* (PIV), en comparación con su contraparte derivada *in vivo*, se traduce en una crío supervivencia deficiente, lo que restringe el uso más amplio de esta prometedora tecnología (5). La producción *in vitro* de embriones es un procedimiento de tres fases que involucra la maduración de ovocitos, la fertilización y el cultivo de embriones *in vitro*. El entorno *in vitro* influye directamente en los fenotipos y resultados embrionarios. Por lo tanto, es muy importante imitar las condiciones que se encuentran *in vivo* para permitir que ocurran todos los eventos inherentes al desarrollo embrionario temprano. (6)

De acuerdo con Reader, Stanton, & Juengel (7) en ovejas y cabras alrededor del 20-30% de los ovocitos recuperados y fertilizados *in vitro* se convierten en embriones transferibles, por lo que consideran necesarias mejoras generales en la selección de ovocitos y embriones de buena calidad, y sistemas de cultivo que puedan promoverlos. Por otra parte, Graña-Baumgartner, et al. (8) mencionan que la mayoría de las pérdidas reproductivas en rumiantes ocurren durante el desarrollo

temprano del embrión principalmente dentro de los 7 días posteriores a la fertilización, las causas potenciales de la pérdida de embriones incluyen anomalías de ovocitos o embriones e insuficiencia lútea para el suministro de progesterona (P4) impidiendo la implantación y el mantenimiento de la preñez. (9)

Varios estudios han asociado la presencia de un cuerpo lúteo (CL) o la fase lútea del ciclo estral con la obtención de ovocitos de mejor calidad y con mayores tasas de producción de blastocistos (Manjunatha B, et al. 2007; Penitente-Filho, et al. 2015), de manera similar Manjunatha B, et al. (10) mencionan que la presencia de un CL y su etapa fisiológica en el momento de la recuperación de los ovocitos parece influir en el número y la calidad de los complejos *cúmulus* recuperados. Por ejemplo, Pirestani, et al. (11) evidenciaron que los ovarios bovinos que tenían un CL en el momento de recolectar los ovocitos producían significativamente más blastocistos que los de la fase folicular o que no contenían un CL. Y en ovejas González-Bulnes, et al. (12) mostraron que la presencia de CL no solo aumentó la tasa de clivaje y la producción de blastocistos, sino que también mejoró la proporción de blastocistos eclosionados después de la vitrificación. Se ha demostrado que los CL afectan la dinámica folicular ovárica en ambos ovarios a través de un efecto sistémico, con evidencia de un efecto ipsilateral local (13). Shabankareha, Habibizadb, Sarsaifia, Cheghamirzac, & Kazemein (14), en su estudio mostraron una mayor disminución en el número de diferentes tamaños de folículos durante el ciclo estral en el ovario ipsilateral en una ovulación doble, así mismo, el hallazgo más importante en este estudio fue la existencia no solo de un efecto sistémico, sino también de un posible efecto intraovárico del CL en la población folicular. Esto se enfatiza por el hecho de que observaron un mayor aumento en el número de folículos en el ovario sin CL, en comparación con una ovulación simple y doble.

Argudo, et al. (15) mencionan que aún se encuentra en discusión el mecanismo o mecanismos precisos por los cuales un CL afecta la capacidad de los ovocitos para madurar, dividirse y alcanzar etapas avanzadas del desarrollo embrionario después de la fertilización *in vitro*. Aunque no está claro si un CL influye en la competencia del desarrollo de los ovocitos mediante interacciones intraováricas o sistémicas o ambas.

Por lo anterior, este proyecto tiene como objetivo evaluar la influencia de la ciclicidad ovárica en hembras ovinas sobre la tasa de recuperación y competencia ovocitaria y sobre la producción *in vitro* de embriones.

1. Planteamiento del Problema

La PIVE es una herramienta que ayuda a comprender el desarrollo temprano de los mamíferos con aplicaciones que van desde el tratamiento terapéutico de la ineficiencia reproductiva hasta la preservación de gametos de animales de alto mérito genético (16) y la aceleración de la mejora genética en el ganado. Sin embargo, el proceso en ovejas todavía es ineficiente: aproximadamente el 70-90% de los ovocitos inmaduros experimentan la maduración, desde la profase I hasta la metafase II; 50-80% se somete a fertilización y avanza al menos a la etapa de dos células entre las 24 y 48 h posteriores a la inseminación; solo del 20% al 50% de los ovocitos inmaduros llegan a la etapa de blastocisto, en el día 7 a 8 después de la fertilización. (3)

Por otra parte, de acuerdo con Penitente-Filho et al. (17) la calidad de los ovocitos depende de la calidad de los folículos en los cuales estos se desarrollan, así mismo, Pfeifer et al. (18) plantean que la calidad de los folículos se encuentra íntimamente influenciada por la dinámica folicular presente en los ovarios, lo que obliga a la coexistencia, en un mismo período de tiempo, de folículos saludables y en crecimiento, y de folículos en diferentes grados de atresia. De igual forma, diversos estudios realizados en esta área indican que factores como el estado nutricional, el estado fisiológico, la edad (19), la etapa del ciclo estral, los niveles hormonales (20) y otros factores inherentes a las hembras donadoras, pueden afectar la capacidad de desarrollo posterior de los ovocitos. Sin embargo, la completa identidad de los factores que determinan la competencia ovocitaria no ha sido totalmente dilucidada, y otros eventos no identificados podrían interferir en este aspecto (20).

Adicionalmente, cuando se usan ovarios provenientes de ovejas sacrificadas en una planta de beneficio como fuente para la obtención de los ovocitos, se desconoce el historial reproductivo, la edad, así como las condiciones nutricionales y la etapa del ciclo estral. Razón por la cual, se tiene una amplia variación en la calidad de los ovocitos recuperados, representando un desafío adicional para el éxito de la maduración *in vitro* (IVM) y la tasa de desarrollo embrionario. (21)

2. Justificación

Los pequeños rumiantes, representan un enorme potencial para la producción de carne y leche. Sin embargo, para aumentar la productividad en la industria ovina y caprina, es necesario mejorar la genética de estas especies. (22)

La producción *in vitro* de embriones (PIV) es una herramienta biotecnológica de la reproducción asistida que brinda la posibilidad de acelerar el progreso genético de los animales, implicando una alta producción de embriones de hembras genéticamente superiores, para que produzcan un mayor número de crías, lo que no sería posible mediante el apareamiento tradicional. (23)

Por otra parte, en cabras y ovejas, un factor crítico que afecta la eficiencia de la producción de embriones *in vivo* es la gran variación en la respuesta de los embriones a los tratamientos de superovulación, la regresión temprana de los cuerpos lúteos y el procedimiento quirúrgico traumático necesario para la recuperación de los embriones. La producción de embriones *in vitro* puede superar algunas de estas limitaciones, una vez que la superovulación no es necesaria, pues los ovocitos pueden ser recuperados directamente de los folículos en hembras con o sin previa estimulación hormonal.

Así mismo, esta tecnología se puede utilizar como estrategia para el rescate de algunas especies animales en peligro de extinción. Además, la criopreservación de los embriones producidos, permite el movimiento y facilita la comercialización de germoplasma, proporcionando una forma segura para el transporte de ganado en todo el mundo. Igualmente, la producción de embriones a

partir de ovocitos de hembras prepúberes, denominada “transferencia de embriones juveniles *in vitro*”, permite un acortamiento del intervalo generacional y, en consecuencia, un aumento de la ganancia genética.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar la influencia de la ciclicidad ovárica en hembras ovinas sobre la tasa de recuperación ovocitaria y la producción *in vitro* de embriones.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la ciclicidad ovárica sobre la calidad oocitaria, medida por las características morfológicas de los complejos *cúmulus* oocitos (CCOs) recuperados.
- Identificar el efecto de la presencia del cuerpo lúteo sobre la tasa de recuperación, la calidad y la competencia nuclear y citoplasmática de los complejos *cúmulus* oocitos, la tasa de clivaje y blastocisto.
- Determinar si existe alguna relación entre la ciclicidad y el potencial de desarrollo hasta el estado de blastocisto.

4. Marco Teórico

4.1 Etapas de la Producción *in vitro* de Embriones

4.1.1 Maduración Ovocitaria.

Durante el proceso de maduración tanto *in vivo* como *in vitro* de los ovocitos ocurren una serie de cambios, que permiten la reanudación de la meiosis. Estos eventos deben ocurrir antes de la fertilización y se caracterizan por la expansión de las células del *cúmulus*, la extrusión del primer corpúsculo polar y la formación de la metafase II. *In vivo*, la hormona FSH es responsable de la inducción de la maduración de los folículos y la hormona LH promueve la reanudación de la meiosis de los ovocitos. (24)

En este sentido, la maduración *in vitro* es un paso clave para proporcionar ovocitos de buena calidad para la fertilización *in vitro* y determina la competencia potencial de desarrollo de los ovocitos. En otras palabras, el requisito previo para obtener un embrión sano es producir un ovocito de buena calidad. Por ejemplo, la maduración *in vitro* inapropiada de los ovocitos es la principal razón de la poliespermia después de la Fecundación *in vitro* (FIV) en comparación con la competencia del desarrollo entre los ovocitos producidos *in vivo* e *in vitro*. (25)

El entorno circundante de los CCO durante la maduración, ya sea *in vivo* o *in vitro*, puede tener efectos profundos en el éxito de la fertilización y el desarrollo posterior del embrión (26). La naturaleza rápida y dinámica de las etapas finales de la maduración de los ovocitos viene acompañada de la necesidad de metabolitos como ácidos grasos, aminoácidos, electrolitos, purinas

y pirimidinas. La glucosa, en particular, es un sustrato energético importante y su adición al medio en concentraciones apropiadas conduce a una mejor maduración y desarrollo de blastocistos (27). Los ovocitos pueden utilizar los aminoácidos como fuente de energía para las células del *cúmulus* y desempeñan un papel importante en el flujo de aminoácidos hacia el ovocito (28). El glutatión (GSH) es un tiol tripéptido que comprende cisteína, prolina y glutamina, y es un importante agente reductor que protege las células contra radicales libres derivados del oxígeno (ROS) y es necesario para la expansión de las células del *cúmulus*. La síntesis de GSH depende en gran medida de los niveles de cisteína, un aminoácido muy inestable que se oxida fácilmente a cistina. Muchos factores, cuando se agregan al medio para la MIV, promueven la absorción de cisteína en los ovocitos y mejoran la síntesis de glutatión en el ooplasma (29). Por lo tanto, la concentración de glutatión citoplasmático después de la MIV es un buen marcador de maduración citoplasmática. (30)

De manera general, los ovocitos deben pasar por tres niveles de maduración, estos son:

- *Maduración nuclear o meiótica:* Depende de la formación y el mantenimiento del huso meiótico que requiere proteínas centrosomales, como el aparato mitótico nuclear y γ -tubulina, así como otras proteínas reguladoras. Se sabe que el envejecimiento de los ovocitos causa la disociación de estas proteínas centrosomales y la desintegración del huso meiótico, lo que resulta en aneuploidía y disminución del potencial de desarrollo. La maduración meiótica representa los eventos nucleares que son inducidos por el aumento de LH o por la retirada del ovocito de su entorno folicular. (31)

- *Maduración Citoplasmática*: Implica la reorganización de orgánulos y el almacenamiento final de ARNm, proteínas, lípidos y factores de transcripción necesarios durante la fertilización y la embriogénesis temprana. Los factores relacionados con el éxito de la maduración citoplasmática no se encuentran bien definidos y a su vez son difíciles de visualizar, lo que dificulta la evaluación de la calidad citoplasmática de los ovocitos (32). Swain & Pool (32) han definido varios sucesos moleculares y celulares controlados por ovocitos que deben ocurrir para permitir una fertilización efectiva, dentro de estos se encuentran: formación de zona pelúcida, expansión de células de *cúmulus*, almacenamiento y señalización de calcio, reubicación y liberación de gránulos corticales, procesamiento de espermatozoides y formación de pro-núcleos. Los orgánulos citoplasmáticos de los ovocitos, como las mitocondrias, las gotitas de lípidos y los gránulos corticales, juegan un papel clave en la determinación de la calidad de los ovocitos. La participación de estos orgánulos también proporciona información sobre las vías metabólicas importantes para el ovocito.

Por otra parte, Labrecque & Sirard (33) mencionan que aún no se ha identificado un conjunto claro de genes expresados que determinan la competencia de los ovocitos. Lo cual indican, sería por causa de la escasa correlación entre el ARNm y la expresión de proteínas en los ovocitos y de la alta variabilidad entre ellos. Así mismo, mencionan que la comparación de la cantidad y calidad de orgánulos y metabolitos entre ovocitos de diferente calidad podría proporcionar una mejor comprensión de los factores que regulan la competencia de los ovocitos e identificar formas en que se puede manipular la calidad de los ovocitos. Sin embargo, destacan que es necesario el uso de buenos modelos de alto y bajo potencial de desarrollo de ovocitos junto con métodos precisos para cuantificar los componentes de los ovocitos.

Es bien sabido que incluso si los ovocitos pueden experimentar una maduración nuclear o meiótica exitosa hasta la etapa de metafase II (MII), cuando se extruye el primer cuerpo polar, es

posible que los ovocitos no hayan logrado una maduración citoplasmática adecuada para completar el desarrollo embrionario. (34)

- *Maduración molecular*: Es el menos definido de los tres niveles de maduración de los ovocitos. Representa la asociación más cercana con la capacidad intrínseca de un ovocito para alcanzar la etapa de blastocisto y probablemente más allá. La diferencia entre un ovocito con capacidad de desarrollo y uno incompetente puede estar relacionada con el estado de diferenciación del folículo de origen y estas diferencias no siempre son visibles en el ovocito a nivel ultraestructural. Actualmente, la hipótesis más popular es que se producen y se añaden ARNm específico y posiblemente algunas proteínas a la reserva de ovocitos en los últimos días antes de la ovulación. Estos “capacitadores” únicos le darían al ovario una última palabra sobre el resultado de la ovulación, al alterar la capacidad de desarrollo del gameto producido. Lo que surge de todas estas observaciones es que las instrucciones especiales, provenientes de un ambiente folicular específico y acumuladas en el ovocito, son esenciales para promover las cascadas moleculares adecuadas para la activación del genoma embrionario y el desarrollo a la etapa de blastocisto. (31)

4.1.2 Preparación Espermática

En mayor medida, el semen de ovino utilizado para la fertilización *in vitro* procede de semen congelado. La preparación del semen congelado de ovino, incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crio-protectores, la separación de los espermatozoides motiles de los no motiles y la capacitación espermática.

a. Lavado del semen y separación de espermatozoides motiles y no motiles: Al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección. Estas son: lavado por centrifugación, swim-up, gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación. El lavado por centrifugación, resulta ser el método más sencillo de todos. El semen se centrifuga 2 veces a 500 g durante 5 a 10 minutos.

b. Capacitación de los espermatozoides: La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica. Durante este proceso, se produce el retiro del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide dejando libres los receptores que interactúan con las células del *cúmulus* y la zona pelúcida del ovocito.

Del mismo modo, se han descrito cambios en las propiedades de las membranas espermáticas: aumento del pH acrosomal, alteración en la proporción entre el colesterol y fosfolípidos y aumento en la permeabilidad al calcio.

Para la capacitación de semen congelado de ovino, se emplean componentes como la heparina, el calcio, células del epitelio oviductal, fosfolípidos vaso activos. La heparina, capacita a las células espermáticas, mediante el desplazamiento de las proteínas decapacitantes de la membrana plasmática y la estimulación de la apertura de los canales de calcio.

4.1.3 Fertilización *in vitro*

Finalizado el periodo de maduración *in vitro*, los ovocitos madurados se encuentran aptos para ser fertilizados. Tanto para condición *in vivo* como *in vitro*, previo a la fertilización de los ovocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, le posibilitará a este progresar a través de las células del *cúmulus* y penetrar la zona pelúcida.

Los ovocitos y los espermatozoides dependen del tiempo, en otras palabras, ambos tienen la capacidad de ser fertilizados o fertilizar en un tiempo limitado. Este tiempo limitado de ovocitos o espermatozoides se denomina "período fértil". Un período fértil largo o corto depende en gran medida de muchos factores, como las razas, la temporada, la edad del donante, el estado nutricional del donante, la calidad de los gametos, las condiciones de cultivo o conservación, incluido el valor de pH, la osmolaridad, los compuestos, los gases, etc. El período fértil de gametos es variable, incluso en los mismos individuos. Por lo tanto, para una fecundación *in vitro* (FIV) exitosa, el tiempo es muy crítico. Los ovocitos y los espermatozoides deben incubarse juntos dentro de sus períodos fértiles para garantizar que el número máximo de ovocitos maduros pueda ser fertilizado por espermatozoides capacitados y apropiados. En general, la FIV tiene lugar a las 20-24 h de la MIV cuando se considera que la mayoría de los ovocitos en medio de maduración ya han alcanzado la metafase de la segunda división meiótica (MII).

El medio de fertilización más común para los ovocitos ovinos es el medio de fluido oviductual sintético (SOF) suplementado con 1 a 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de heparina + 2 a 20% de suero fetal bovino o de oveja, respectivamente. De acuerdo con la revisión realizada por Zhu, et al. (3), independientemente de otras condiciones, la tasa de blastocisto de los ovocitos FIV con suero al 2% varía del 20% al 59,2%, mientras que con suero al 20% varía del 24,1% al 42%. De modo que,

es posible afirmar que una alta concentración de suero parece contribuir a una mayor poliespermia en los ovocitos fertilizados y reduce el número de desarrollo embrionario normal.

4.1.4 Cultivo *in vitro*

En comparación con la MIV y la FIV, la duración del cultivo de embriones es mucho más prolongada, necesita de 6 a 8 días. Por lo tanto, el medio de cultivo es extremadamente importante para el desarrollo del embrión *in vitro*. Al igual que la MIV y la FIV de ovocitos ovinos, los procedimientos de cultivo *in vitro* de embriones ovinos no se han modificado significativamente en la mayoría de los laboratorios del mundo durante más de dos décadas. Los cigotos ovinos se cultivan en medio de fluido oviductual sintético (SOF) suplementado con aminoácidos (AA) y albúmina de suero bovino (BSA - Bovine Serum Albumin). Esta combinación es el medio de cultivo básico estándar o convencional para embriones de oveja. Para reducir la incidencia de oxidación, la concentración de oxígeno se mantiene al 5% (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂). La formación de blastocisto ocurre en los días 6 a 8 de cultivo. Durante el cultivo de embriones, el medio de cultivo se suele cambiar cada 48 h, o se aplica con cultivo de dos pasos, es decir, en los primeros tres días los embriones se cultivan en SOF + AA + BSA y el día 4 se transfieren en SOF + AA + glucosa + suero ovino/bovino o BSA y cultivado en el medio hasta el día 8. Aparentemente, debido a que los embriones se mantienen en cultivo durante un largo período de tiempo, las condiciones de cultivo inadecuadas para algunos embriones de mamíferos pueden causar cambios epigenéticos en la impronta genómica, lo que conduce a anomalías del desarrollo. Los estudios sobre el genoma embrionario indican que las condiciones de desarrollo embrionario

in vitro utilizadas actualmente no pueden imitar completamente las condiciones *in vivo* sobre la expresión del ARNm.

4.2 Competencia ovocitaria

La capacidad de un ovocito para someterse a una maduración citoplasmática y nuclear, una fertilización y un desarrollo embrionarios exitosos se conoce como la calidad del ovocito o la competencia de desarrollo (7). En algunos casos, la definición se amplía para incluir la posibilidad de mantener la preñez hasta un nacimiento vivo. Desde el punto de vista de la biología del desarrollo, esta propiedad de los gametos abarca algunas de las transiciones biológicas más críticas y complejas. Estos incluyen la remodelación del gameto para aceptar e integrar el espermatozoide, la reprogramación nuclear para la totipotencia en el cigoto y la activación del genoma embrionario (EGA). (35)

De manera general los ovocitos poseen cinco niveles de competencia de desarrollo: a) Capacidad para reanudar la meiosis, b) capacidad de dividirse después de la fertilización, c) capacidad para desarrollarse hasta la etapa de blastocisto, d) capacidad para inducir una preñez y llevarlo a término, e) capacidad para desarrollarse a término con buena salud. (31)

Muchos investigadores se centran en la identificación de marcadores celulares y moleculares para seleccionar el ovocito y el espermatozoide más competentes para producir embriones con mayor potencial de implantación. Sin embargo, actualmente la eficiencia de las tecnologías de producción *in vitro* (PIV) en especies como bovina, equina y porcina, medida como la proporción de ovocitos inmaduros que alcanzan la etapa de blastocisto, rara vez excede el umbral del 30-40%, lo que significa que la proporción de ovocitos que no se desarrollan después de la maduración, fertilización y cultivo *in vitro* es considerablemente grande. (36)

Asimismo, dado que la forma más habitual de obtener los ovarios son los animales de matadero, muchos factores importantes que influyen en la calidad de los ovocitos, como la edad de la donante, la etapa del ciclo estral, el estado nutricional, el potencial genético, la presencia de un trastorno reproductivo, y otros, a menudo se desconocen (37). Por lo tanto, es casi imposible evitar la recuperación de una población heterogénea de ovocitos que tienen una capacidad distinta para madurar y apoyar el desarrollo embrionario temprano después de la fertilización. (36)

En este sentido, la calidad intrínseca del ovocito es uno de los principales factores que afectan el desarrollo embrionario temprano, y que las condiciones de cultivo del embrión tienen un papel crucial en la determinación de la calidad del blastocisto, la selección precisa de ovocitos competentes es vital para las tecnologías de PIV. (38)

- *Competencia Celular:* Durante el desarrollo de los embriones deben producirse modificaciones en las propiedades de los orgánulos citoplasmáticos, como la ubicación, la morfología y la actividad bioquímica, para lograr una alta calidad durante el desarrollo. (31)

Calidad de las mitocondrias: Las mitocondrias son el orgánulo más frecuentemente estudiado en relación con la competencia del desarrollo. Sus funciones en el ovocito incluyen la producción de ATP y el control de Ca^{2+} y la homeostasis redox (39). Una calidad baja o alta del ovocito se encuentra relacionada con el número de mitocondrias, la distribución mitocondrial citoplasmática y el potencial de membrana mitocondrial. (40)

Previamente a la maduración de los ovocitos, las mitocondrias son esféricas con pocas crestas y se presume que son relativamente inactivas. En especies como la vaca, la oveja y la cabra, las

mitocondrias poseen una estructura en forma de arco o "capucha", la cual se vuelve más frecuente durante las últimas etapas de crecimiento y maduración (40). En el estudio de Reader, Cox, Stanton, & Juengel (40), observaron que Los ovocitos de cordero juveniles tenían una mayor proporción de mitocondrias encapuchadas antes de la maduración y una proporción menor después de la maduración, en comparación con los ovocitos de oveja adultas más competentes. Concluyendo que, generalmente los ovocitos de mala calidad se caracterizaron por una morfología mitocondrial alterada. De acuerdo con Galloway, Lee, & Yoon (41) los cambios en la morfología mitocondrial podrían reflejar cambios en el estado energético de las mismas.

Por otra parte, en la mayoría de las especies, las mitocondrias se mueven desde una ubicación periférica a una distribución más uniforme en todo el citoplasma del ovocito durante la maduración (40). De acuerdo con Brevini, Vassena, Francisci, & Gandolfi (42) y Stojkovic, et al. (43) los ovocitos maduros de vacas y cerdos cuyas mitocondrias se encontraban distribuidas uniformemente por todo el citoplasma, poseían mayor potencial de desarrollo. De manera similar, Reader, Cox, Stanton, & Juengel (40) informaron que antes de la maduración, los ovocitos de cordero prepúberes menos competentes poseían una mayor densidad de mitocondrias en el centro, pero luego de la maduración, las mitocondrias se encontraban distribuidas uniformemente en los ovocitos. En general, una mayor calidad de los ovocitos se asocia con una distribución uniforme de las mitocondrias en todo el citoplasma del ovocito maduro.

Por otra parte, las alteraciones en las funciones mitocondriales normales pueden conducir a enfermedades metabólicas que afectan el desarrollo previo a la implantación. Durante el ciclo de división celular temprano, el embrión tiene una mayor cantidad de mitocondrias almacenadas, que se diluyen a medida que avanzan las divisiones (6). De acuerdo con Lee, et al. (44) por este motivo los blastocistos tienen pocas copias por célula, considerado el mecanismo de transmisión de alta

calidad por la teoría del cuello de botella, por lo tanto, solo en el período de implantación, el embrión es capaz de replicar el ADN mitocondrial (ADNmt). Así mismo, Wakefield, Lane, & Mitchell (45) mencionan que los problemas en la función mitocondrial conducen a una reducción de las tasas de división y a la aparición de aneuploidía. Además, la baja producción de ATP y la disminución de las copias de ADNmt están relacionadas con embriones de mala calidad.

Respuesta al estrés exógeno: El mecanismo principal para iniciar la vía de respuesta al estrés celular se encuentra en el retículo endoplásmico (RE). Este orgánulo se encarga de secretar diversas proteínas involucradas en varios procesos biológicos y su control de calidad se encarga de detectar fallas en el mantenimiento del funcionamiento de las células que incluyen procesos de división celular, homeostasis y diferenciación (46). La alteración en la señalización de estrés del retículo endoplásmico, especialmente en la proteína GRP78 / BiP, conduce a problemas en el período de pre-implantación, falla en la eclosión del blastocito y defectos en la división celular y apoptosis de la masa celular interna. (47)

4.2.1 Factores que afectan la competencia ovocitaria.

- *Estructuras ováricas:* La presencia o ausencia de folículos y cuerpo lúteo (CL), se ha utilizado como un criterio sencillo y no invasivo para acceder al desarrollo competente de los ovocitos. Manjunatha et al. (10) informaron que el desarrollo embrionario era mayor en los ovocitos procedentes de ovarios con un CL y sin folículo dominante, por su parte, Pirestani et al. (2011) informaron que los ovocitos derivados de ovarios que contienen un folículo grande (~ 20

mm) eran menos competentes en comparación con los derivados de ovarios que contienen un CL. De manera general, estos estudios indican que la presencia de un folículo dominante en el ovario influiría negativamente en el desarrollo posterior del embrión, mientras que la presencia de un CL favorece la competencia de los ovocitos.

La evidencia en varias especies de rumiantes indica que la función lútea afecta la competencia del desarrollo de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano (10). De acuerdo con Argudo, et al. (15) la presencia de un CL y su etapa fisiológica en el momento de la recuperación de los ovocitos parece influir en el número y la calidad de los CCOs recuperados, sus resultados mostraron que los ovocitos recogidos de los ovarios portadores de un CL eran más grandes y una mayor proporción de ellos había completado la fase de crecimiento que los que carecían de CL. Además, los ovarios con CL produjeron ovocitos más sanos, tuvieron mayores tasas de división y produjeron más embriones totales y blastocistos más avanzados el día 7 que los ovarios sin tejido lúteo, concluyendo que el CL influyó en la competencia del desarrollo de los ovocitos y el desarrollo embrionario probablemente a través de interacciones intraováricas (15). De manera similar, en el estudio de Penitente-Filho, et al. (48) realizado en bovinos, se recuperaron más ovocitos totales y de alta calidad de los ovarios portadores de un CL que de los que carecen de estructura lútea.

En la investigación realizada en ovejas por González-Bulnes, et al. (12) la presencia de CL durante el tratamiento con progestágeno antes de la administración de FSH como parte de un protocolo superovulatorio aumentó el número de embriones transferibles 1,8 veces y la viabilidad de dichos embriones 1,3 veces en comparación con las ovejas sin conocimiento previo del estado lúteo. Los ovocitos de los ovarios con CL mostraron mayores tasas de fertilización, desarrollo de blastocisto y tasas de clivaje después de la vitrificación que las ovejas sin CL. Este mismo estudio

menciona que la ausencia de un CL ejerce un efecto negativo sobre la viabilidad de los embriones al aumentar la tasa de degeneración. (12)

Sin embargo, estudios como el de Hajarian, Shahsavari, Karami S, & Dashtizad (21) reportan que las tasas de eclosión y blastocistos de los ovocitos sin CL fueron mayores que las de los ovocitos con presencia de CL. Concluyen que el uso de ovocitos provenientes de ovarios sin CL puede disminuir los problemas asociados con la producción de embriones *in vitro* de embriones bovinos, pero destacan que la calidad de los ovarios es un factor importante para aumentar el resultado de la PIVE. De manera similar, un estudio realizado en ovejas occidentales de cara blanca, demostró que la presencia de CL suprime localmente el número de folículos antrales que no crecen más allá de los 3 mm de diámetro (49). Islam, et al. (50) concluyeron que los ovarios caprinos sin CL producen un mayor número de ovocitos de alta calidad que aquellos con CL. Así mismo, Quezada-Casasola, et al. (51) informaron de una menor tasa de maduración de los ovocitos bovinos originados a partir de ovarios con CL, que se sugirió ejerce su efecto negativo por un mecanismo paracrino sobre el ovocito. Peralta-Torres, Aké-López, Segura-Correa, & Aké-Villanueva (52) también obtuvieron una mayor proporción de ovocitos viables en los ovarios sin CL, pero manifiestan que pudo deberse a un mejor ambiente folicular como resultado de una mayor concentración de gonadotropinas y otros factores por la falta de progesterona e inhibina secretada por el CL.

Los resultados son contradictorios, de manera que no hay certeza a cerca de los mecanismos por los cuales un CL influye en la capacidad de desarrollo de los ovocitos o en el desarrollo embrionario posterior (15). Sin embargo, Abdelnaby, Abo El-Maaty, Ragab, & Seida (53) menciona que un mayor flujo sanguíneo a un ovario que lleva un CL podría aumentar la distribución de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento en el tejido circundante,

favoreciendo el crecimiento folicular y el desarrollo de los ovocitos. Por el contrario, Shabankareh, Kor, & Hajarian (54) la disminución de la sangre que llega a un folículo en desarrollo, por causa de los nuevos vasos sanguíneos formados para CL durante su formación da como resultado una disminución del suministro de gonadotropinas hipofisarias y otras sustancias necesarias para el desarrollo adecuado del ovocito y el folículo. Este mecanismo puede afectar la maduración posterior del ovocito, así como la competencia y calidad del desarrollo embrionario posterior. (55)

- *Tamaño del Folículo:* En general, se considera que los ovocitos de folículos más grandes tienen mayor potencial de desarrollo que los de folículos más pequeños, ya que se supone que han tenido más tiempo para crecer y acumular los componentes necesarios para la maduración (56). Trabajos como el de Annes, et al. (57) y Alves, et al. (58) han informado que el microambiente del líquido folicular (FF) de los folículos grandes tiene niveles más altos de electrolitos, glucosa, especies reactivas de oxígeno, glutatión, actividad superóxido dismutasa, lípidos, colesterol, piruvato y estradiol y que además los ovocitos derivados de folículos de mayor tamaño también muestran un patrón transcripcional diferente para la remodelación de la cromatina y las vías metabólicas, como el metabolismo lipídico, el estrés celular y la señalización celular, con respecto a los que provienen de tamaños más pequeños, lo que favorecería su potencial de desarrollo, por lo que, acorde con sus resultados, los folículos grandes proveen un microambiente apropiado para que el ovocito alcance un mejor desarrollo embrionario. (57,58)

Por otra parte, en ovejas, estudios como el de Tan, et al. (59) han demostrado que aproximadamente el 48% de los ovocitos obtenidos de folículos antrales pequeños (0,5-1,0 mm) pueden reanudar y completar la maduración meiótica hasta la metafase II (MII) cuando se maduran

en cocultivo con células del *cúmulus* (CC) de tamaño mediano (3,0–4,0 mm). Quan, et al. (60) informaron que la integridad de las CC es importante para asegurar la competencia de desarrollo de los ovocitos inmaduros de ovino de folículos antrales de 2,0 a 6,0 mm de diámetro. Así mismo, Cecconi, et al. (61) mencionaron que la baja competencia de desarrollo de los CCOs cultivados *in vitro*, recolectados de pequeños folículos antrales puede estar relacionada con la incapacidad de los CC para secretar factores capaces de activar vías de señalización que promueven la maduración meiótica en especies ovinos.

- *Morfología de los complejos cúmulus-ovocito*: Los criterios morfológicos abarcan el número y apariencia de capas de *cúmulus* y las características citoplasmáticas del ovocito, como el brillo de su citoplasma. Básicamente, la calidad de complejo *cúmulus-ovocito* CCOs más saludable (Clase I) se relaciona con una cubierta completa de *cúmulus* con varias capas de células compactas; la calidad media (Clase II) tiene solo una cubierta de *cúmulus* parcial y / o *cúmulus* ligeramente expandidos que contienen menos de cinco capas de células; por último, la de peor calidad (Clase III) tiene un citoplasma más oscuro y la presencia de manchas oscuras con *cúmulus* expandidos, todo indicativo de atresia folicular. Sin embargo, tales criterios de clasificación varían entre laboratorios. (36)

Los diferentes estudios que se han realizado en torno a la morfología de los CCOs coinciden en que aquellos que muestran signos de atresia temprana producen tasas altas de blastocistos en comparación con los CCOs morfológicamente sanos. Sin embargo, de acuerdo con lo que reportó De Wit, Wurth, & Kruij, (62) la atresia avanzada, con signos como granulaciones citoplasmáticas, menos de cinco capas de *cúmulus* y *cúmulus* expandidos con masas celulares oscuras o, estrictamente, su ausencia completa, muestran un potencial *in vitro* más bajo medido por las tasas

de escisión y la formación de blastocistos. En este sentido Aguila, et al. (2020) recomiendan que al seleccionar los CCOs, lo ideal sería apuntar a los CCOs con varias capas de células de *cúmulus* (más de o al menos cinco capas), compactas y / o ligeramente expandidas, con o sin áreas oscuras en el ovocito y *cúmulus*

- *Contenido de Lípidos:* Los lípidos, son moléculas de señalización con funciones importantes en la maduración de los ovocitos y la adquisición de competencia (63). En la última etapa de la maduración de los ovocitos y durante el desarrollo previo al implante, los lípidos endógenos de los ovocitos funcionan como fuente de energía (64). Estudios como el de Dadarwal, et al. (65) han reportado que la falta de uso de lípidos en los ovocitos está relacionada con una maduración nuclear inadecuada. Los lípidos en los ovocitos son principalmente triglicéridos de ácidos grasos específicos que difieren según la especie, almacenados en distintos orgánulos de gotas que se reubican durante la maduración de los ovocitos. La presencia de lípidos, particularmente ácidos grasos saturados frente a insaturados, *in vitro* los sistemas de maduración afectan el contenido de lípidos de los ovocitos y la competencia del desarrollo. (66)

Los ácidos grasos son una clase de lípidos y funcionan como componentes estructurales de las membranas, precursores de la síntesis de prostaglandinas y para anclar proteínas a las membranas celulares. Los ácidos grasos también se almacenan intracelularmente como triacilglicéridos dentro de gotitas de lípidos, proporcionando una potente fuente de energía a demanda; por ejemplo, la oxidación del palmitato de ácido graso puede generar 106 moléculas de ATP en comparación con la oxidación de la glucosa, que produce aproximadamente 30 moléculas de ATP. (66)

Los lípidos se agregan en forma de grupos oscuros que pueden verse en el ooplasma como una oscuridad citoplasmática. La oscuridad citoplasmática puede ser homogénea, afectando a todo el

citoplasma o concentrada en el centro, con un anillo periférico claro que le da al citoplasma un aspecto oscurecido. Este aspecto opaco es más intenso en cerdos y gatos domésticos, seguido de vacas y finalmente ovejas y cabras, cuyo ooplasma es más claro. En el caso de los equinos, la polarización de los lípidos se observa comúnmente, lo que facilita la visualización del espermatozoide dentro del ovocito. (67)

Diversos estudios han investigado la relación entre el contenido de lípidos de los ovocitos y la competencia, encontrando que un ooplasma oscuro indica una acumulación de lípidos y un buen potencial de desarrollo, un ooplasma de color claro indica una deficiencia de depósitos de lípidos y un potencial de desarrollo deficiente, y un ooplasma negro indica envejecimiento y bajo potencial de desarrollo. (68)

Diversos estudios han cuantificado los lípidos en los ovocitos y han determinado que el triacilglicerol es el componente principal. La comparación de ovocitos de vaca, cerdo y oveja reveló que el cerdo tenía la mayor cantidad de triglicéridos con ~ 74 ng por ovocito, aproximadamente tres veces más que tanto la vaca como la oveja (69). De acuerdo con Genicot, et al. (70) el cerdo posee la mayor cantidad de ácidos grasos totales (~ 160 ng por ovocito) 2,5 veces más que la vaca y 1,8 veces más que la oveja. En su estudio, los ácidos palmítico, esteárico y oleico fueron los más abundantes en los ovocitos de vaca, cerdo y oveja, pero el cerdo tuvo más ácidos palmítico que oleico, mientras que la vaca y la oveja tuvieron mayor ácido oleico relativo.

El contenido de lípidos de los ovocitos puede verse alterado por el entorno en el que madura el ovocito, en particular por los suplementos de suero y lípidos utilizados para la MIV. De acuerdo con Kim, et al. (71) los ovocitos bovinos madurados en FCS al 10% tienen más triacilglicerol y más colesterol que los maduros en condiciones sin suero. De acuerdo con Su, et al. (72) el suero también contiene una serie de factores de crecimiento, citocinas y metabolitos, que podrían

aumentar los lípidos intracelulares mediante la inducción de la captación de ácidos grasos mediada por transportadores y / o la biosíntesis de triglicéridos. Así mismo mencionan que es probable que las células de los *cúmulus* influyan directamente en la deposición de triacilglicerol y / o ácidos grasos de los ovocitos, similar a su papel en el control del contenido de colesterol de los ovocitos.

- *Efectos de las temporadas reproductiva y no reproductiva:* La reproducción de las ovejas depende de la temporada. Debido a esto, la mayoría de los laboratorios experimentan reducciones periódicas en el rendimiento de embriones (73). Con el fin de evaluar el efecto de la temporada en las tasas de escisión, blastocistos y partos de *in vitro* Mara, Sanna, Casu, Dattena, & Muñoz (74) produjeron embriones de ovino durante 3 años de recopilación de datos. Se definieron los medios de maduración y cultivo de embriones, TCM199 + BSA y SOF + BSA, respectivamente. Los ovocitos maduros se fertilizaron con semen fresco en fluido oviductal sintético (SOF) con suero de oveja estral inactivado por calor al 20%. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en las tasas de división entre temporadas en ninguno de los 3 años examinados, aunque la tasa de blastocistos varió significativamente entre temporadas en 2005 y 2007 ($P < 0,05$) y en 2006 ($P < 0,001$). Además, no hubo diferencias en las tasas de preñez y partos entre los embriones durante el anoestro versus durante la temporada de reproducción. Finalmente, los autores concluyeron que solo la tasa de blastocistos parecía haber sido afectada por la temporada (74). Por otra parte, Shi, et al. (75) realizaron un experimento *in vivo* para investigar los efectos de la estación sobre la superovulación en ovejas Black Suffolk, particularmente la tasa de ovulación y la calidad del embrión. Las ovejas fueron superovuladas en las temporadas reproductiva y no reproductiva, respectivamente, seguidas de inseminación artificial intrauterina laparoscópica. Se recuperaron la mórula y los blastocistos viables y se transfirieron

inmediatamente a los receptores. Los resultados mostraron que la tasa de ovulación de la oveja fue mayor en la temporada no reproductiva, mientras que la tasa de viabilidad del embrión fue mayor en la temporada reproductiva (75). Además, aunque no se observó una diferencia significativa en la tasa de supervivencia de los embriones viables transferidos y el número de crías por oveja donante entre las dos temporadas, por el contrario, la relación descendencia / óvulos de las ovejas donantes superovuladas en la temporada no reproductiva fue menor ($P < 0,01$).

- *Temperatura ambiental:* Las temperaturas ambientales altas más allá de la capacidad fisiológica del animal para disipar el exceso de calor corporal pueden provocar hipertermia y estrés por calor (76). El estrés por calor puede afectar potencialmente la mayoría de los aspectos de la reproducción en mamíferos, ya sea directa o indirectamente. Estos incluyen interrupciones en el desarrollo de gametos masculinos y femeninos, en la maduración de ovocitos, en el desarrollo embrionario temprano, o en el crecimiento fetal y placentario. (77)

Los impactos del estrés por calor se han estudiado ampliamente en los diversos aspectos de la reproducción en la especie bovina. Se ha sugerido que los folículos primordiales y los ovocitos en crecimiento que se encuentran dentro de estos son resistentes al estrés por calor (78). En cuanto a los folículos preantrales, no está claro si son sensibles al estrés por calor o no (79). En contraste, los datos experimentales indican que después de la formación del antro, los folículos se vuelven sensibles al estrés por calor, y los cambios que ocurren en estos folículos debido al estrés por calor pueden afectar las etapas avanzadas del crecimiento folicular. Además, los efectos de estos cambios se extienden más allá de la estación cálida. (79)

En los ovinos, de acuerdo con el estudio de Ahmadi, Nazari, & Hossini-Fahraji, (76), los impactos letales de las altas temperaturas ambientales se han estudiado más sobre el bienestar, la producción y la fisiología de los animales que sus efectos causan en la reproducción. Sin embargo, comúnmente se dice que varios procesos reproductivos de la oveja, tales como la función endocrina, el ciclo estral, la ovulación, el crecimiento de la placenta, la supervivencia embrionaria, y el crecimiento fetal, pueden ser afectados por el estrés por calor. (80)

En el estudio realizado por Ahmadi, Nazari, & Hossini-Fahraji, (76) en el cual evaluaron el potencial de desarrollo *in vitro* de los ovocitos de oveja durante los meses más cálidos y fríos del año y la tolerancia de los ovocitos al estrés térmico, encontraron que los ovarios produjeron más CCOs con morfología aceptable en invierno que en verano. Los ovarios de oveja tenían menor capacidad para producir CCOs morfológicamente normales en verano en comparación con invierno ($P < 0,05$). El total de CCOs aspirados por ovario fue equivalente en ambas temporadas, y se tuvo una menor eficiencia en la producción de embriones en el verano debido a la mayor proporción de CCOs de baja calidad en esta temporada.

- *Edad del Donante:* En la mayoría de ocasiones, los ovocitos son recolectados de mataderos, de modo que no es posible saber la edad de los donantes de ovocitos. Sin embargo, existen investigaciones que han demostrado que la edad del donante de ovocitos es un factor significativo que influye en la competencia del desarrollo del ovocito (7). De acuerdo con Iwata, et al. (81) en los animales adultos, incluidos los humanos, la competencia de los ovocitos se reduce con la edad. En este sentido, Armstrong (82) mencionó que los ovocitos de donantes juveniles y los embriones derivados de ellos parecen menos robustos y pueden ser menos

tolerantes a la manipulación subóptima y las condiciones de cultivo *in vitro* que los ovocitos adultos, además de una menor tolerancia a condiciones inapropiadas.

En el estudio de Ptak, et al. (83) solo el 0,7% y el 4% de los ovocitos de cordero recolectados produjeron descendencia en comparación con el 13% y el 11% de los ovocitos de ovejas adultas tras la PIVE y la transferencia a receptores adultos. De acuerdo con Armstrong (82) las anomalías relacionadas con la edad de los ovocitos de los corderos incluyen: a) incompetencia meiótica o incapacidad para completar la maduración meiótica que da lugar a ovocitos incapaz de fertilización; b) errores en la meiosis que pueden ser compatibles con la fecundación pero que conducen a anomalías genéticas que comprometen la viabilidad del embrión; y c) deficiencias citoplasmáticas que se expresan en varias etapas de desarrollo antes o después de la fertilización.

5. Materiales y métodos

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Cooperativa de Colombia (UCC), ubicado en el Centro Académico Agropecuario Guatiguará, localizado en el municipio de Piedecuesta (Santander, Colombia).

Para los procesos de FIV y CIV, es requerido pasar por los procedimientos de recuperación de CCOs y MIV, procesos que se realizaron en la primera fase del proyecto de investigación.

5.1 Recolección de ovarios.

Se obtuvieron ovarios de hembras ovinas provenientes de una planta de beneficio CAPRINOS ALVAREZ ubicada en la ciudad de Bucaramanga, en el Barrio la Feria. Los cuales fueron separados por pares en bolsas de cierre hermético correspondientes al mismo animal (Figura 1). Estos fueron transportados en un termo con solución salina [(0.9% NaCl) suplementados con antibióticos (100 UI/mL de penicilina y 1 mg de estreptomicina)], con agua atemperada a 30 - 35°C, para conservar la viabilidad de las células en el tiempo transcurrido hasta el laboratorio.

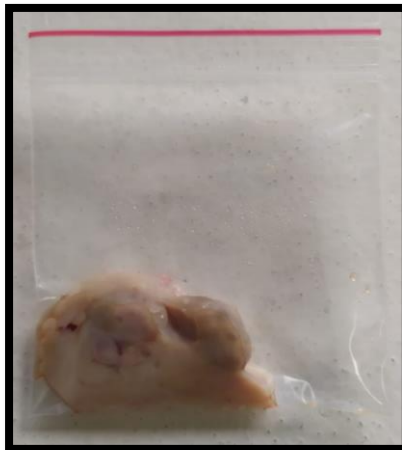


Figura 1. Par de ovarios por hembra faenada.
Fuente: Autor.

Al llegar al laboratorio los ovarios por pares, fueron debridados, se retiraron todas sus estructuras anexas para evitar cualquier tipo de contaminación y conservar la estructura ovárica limpia y sola. Hasta este punto, los ovarios se mantuvieron por pares correspondiente a cada hembra ovina, para su posterior clasificación por tratamientos, luego fueron lavados con solución salina [(0.9% NaCl) suplementado con antibióticos (100 UI/mL de penicilina y 1 mg de estreptomicina)] a una temperatura de 37.5 °C (Figura 2).

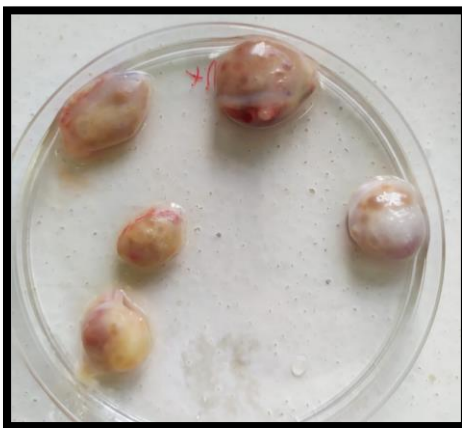


Figura 2. Ovarios lavados y debridados
Fuente: Autor.

5.2 Selección de los ovarios por tratamiento

Los ovarios se separaron en cajas de Petri por par de ovarios de la siguiente manera: NCL (No Cuerpos Lúteos) o anovulatorios, en este grupo entraban aquellas hembras a las cuales en ningún ovario tanto derecho como izquierdo había presencia de cuerpos lúteos. Monovulatorios; aquellas hembras con presencia de un cuerpo lúteo ya sea en ovario derecho o el izquierdo. Y poliovulatorios; aquellas hembras con dos o más cuerpos lúteos en los ovarios (uno en el derecho y otro en el izquierdo o todos en un ovario). (84)

Cada tratamiento se le adicionó una solución buferada fosfatada (PBS) Syngro® Holding el cual ayudó a mantener la viabilidad de las células (Figura 3).



Figura 3. Solución buferada fosfatada (PBS)

Fuente: Autor.

5.3 Grupos experimentales

Luego de clasificar los ovarios con respecto a la presencia o ausencia del CL, se estratificaron en 5 subgrupos o tratamientos de la siguiente manera:

- NCL: CCOs provenientes del grupo anovulatorios de ovarios con ausencia del CL.

- M+ y M-: CCOs provenientes del grupo monovulatorios. El grupo M+, aquellos CCOs ipsilaterales al cuerpo lúteo y M- CCOs del ovario contralateral.
- P+ y P-: CCOs provenientes del grupo poliovulatorios. El grupo P+, aquellos CCOs ipsilaterales a los cuerpos lúteos y P-, CCOs contralaterales es decir de aquel ovario que no había presencia de ningún cuerpo lúteo.

5.4 Recuperación y clasificación de los CCOs

Una vez clasificados los ovarios, se inició el proceso de recuperación por el método de *Slicing* (corte y rebanado) que consiste en la realización de cortes longitudinales y transversales con una hoja de bisturí, en la superficie del ovario para liberar el contenido folicular en una placa de cultivo. (24)

En este proceso se utilizaron cajas de Petri plásticas, pinzas y cuchillas hojillas de bisturí. Se tomó el ovario y con ayuda de la pinza se ejerció presión sobre este y con la hojilla de bisturí se realizó el corte sobre los folículos para obtener los complejos *cúmulus*-ovocitos (CCOs), finalizado el corte, fue realizado un lavado con solución de holding. Posterior a esto, se colocó el contenido en tubos de falcón de 50 ml, teniendo en cuenta la clasificación anteriormente realizada a los ovarios, se dejaron reposar durante 10 minutos con el fin de que los complejos *cúmulus*-ovocitos (CCOs), se fueran al fondo del tubo. Luego, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se tomaron del fondo del tubo de falcón y se depositaron en una caja de Petri nueva. Bajo observación a través de estereoscopio se procedió a realizar la clasificación de los CCOs grado I y II para el procedimiento de la FIV.

5.5 Maduración *in vitro* de los ovocitos

Clasificados los complejos *cúmulus* ovocitos, los ovocitos clasificados como tipo I y tipo II se colocaron en gotas de medio de lavado TCM 199 con HEPES para proceder a limpiarlos y retirar de ellos todos los detritos celulares y demás contaminaciones que se pudiesen encontrar en el fluido folicular. Cada grupo de células de tratamiento pasó por cuatro gotas de lavado, que consistió en TCM-199 (Medio de cultivo para tejidos, SIGMA) con HEPES, suplementado con suero fetal bovino [250 µL], Penicilina y Estreptomicina [5 µL], previamente atemperado a 38.5°C.

Posteriormente, los ovocitos lavados fueron pasados a una gota de medio de maduración previamente atemperado a 38.5°C, y gasificado en atmosfera con 5% de CO₂. Para este propósito se prepararon 5 mL de medio de maduración el cual contenía TCM-199 (Medio de cultivo para tejidos, SIGMA) sin HEPES, suplementado con FSH/LH [25 µL], Penicilina y Estreptomicina [5 µL], aditivo [125 µL], Cysteamina [34 µL] y Suero fetal bovino [500 µL].

La maduración de los CCOs se realizó en incubadora durante 22-24 horas, en gotas de 100 µL de medio de maduración, cada una marcada con su grupo correspondiente, siendo recubiertas por aceite mineral (SIGMA) previamente filtrado.

5.6 Fertilización *in vitro*

Una vez transcurrido el tiempo de maduración, se prepararon 1,8 mL del medio de fertilización que compuesto de medio IVF-SOF [1692 µL], adicionado de Penicilamina, Hipotaurina y hepinefrin (PHE) [36 µL], Heparina [36 µL] y CaCl₂ [36 µL], también se prepararon las microgotas correspondientes para cada grupo experimental. Para ello se tomó una caja de Petri de 35x10 mm (NUNC ®) en la cual se realizaron 5 gotas de 50 µL, cada una marcada con su grupo

correspondiente, siendo recubiertas por aceite mineral (SIGMA) previamente filtrado. Así mismo se preparó el medio de lavado y todo se colocó tres horas antes en la incubadora a una temperatura de 38,5°, humedad relativa de más del 90% y CO₂ al 5%.

Posterior a esto se extrajeron los ovocitos del medio de maduración que para ese momento ya habían tenido un proceso de expansión de las células del CCOs y posteriormente se procedió a realizar un lavado en el medio de lavado antes mencionado, en el que se quitó una parte de las células de CCOs sin desnudarlos completamente, después de esto se pasaron a una gota de medio de fertilización y luego a la caja de Petri previamente preparada. Luego de esto se procedió a preparar las columnas de percoll de la siguiente manera:

- *Preparación de las columnas de Percoll y manejo del semen para la FIV:* Se prepararon los tres gradientes de Percoll (90, 60 y 30%), en un tubo de microcentrifuga realizando tres columnas, cada una con 300µL, depositando el Percoll 90% en el fondo seguido por el de 60% y finalizando con el de 30% (Figura 4). También se colocaron 600 µL de TALP de lavado y todo se colocó a una temperatura de 38,5° durante 30 min.

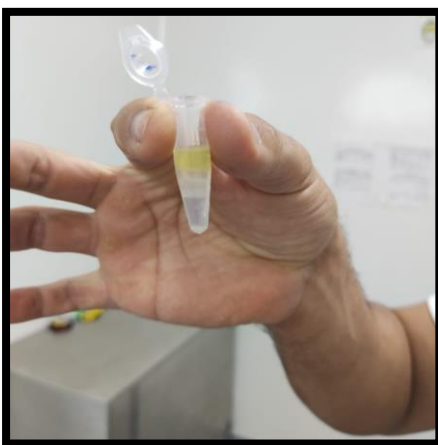


Figura 4. Columnas de PERCOLL

Fuente: Autor.

Se descongelaron las pajillas en baño María a una temperatura de 37,5°C durante 30 segundos, posteriormente se secó la pajilla y se depositó en un tubo de microcentrífuga. Se tomó una muestra de 10 µL y se colocó sobre una lámina que se encontraba sobre la placa calentadora a una temperatura de 38°C y se procedió a observar en el microscopio, para evaluar la calidad seminal.

Se colectaron 250 µL de semen y se colocaron en la parte superior de las tres columnas de Percoll, para ser centrifugados durante 6 minutos a 9000 RPM (centrifuga minispin, Eppendorf®, Hamburg).

Una vez terminada la centrifugación, se tomaron 100 µL pellet del fondo del tubo y se colocaron en el Talp de lavado durante 45 segundos a 5500 RPM (centrifuga minispin, Eppendorf®, Hamburg). Luego se procedió a realizar el conteo de espermatozoides (Spz) en cámara de Neubauer para determinar la concentración espermática, mediante una dilución de agua [95 µL] y semen [5 µL].

Se determinó la concentración por medio de la siguiente formula:

$$C1 \times Vol 1 = C2 \times Vol 2$$

Se procedió a fertilizar los ovocitos, usando la concentración espermática calculada y se mantuvieron en la incubadora durante 18 a 20 horas.

5.7 Cultivo *in vitro*

Pasadas las 18- 22 horas de fertilización de los ovocitos, se procedió a realizar el medio de cultivo, para ello se utilizaron cajas de Petri de 35x10 mm (NUNC ®), se hicieron gotas de 100 μ L de medio de cultivo (SOF 1) que fueron identificadas de acuerdo a cada grupo experimental, este medio fue colocado tres horas antes en la incubadora con una temperatura de 38.5°C, humedad de más del 90% y gasificado con trigas (nitrógeno 90%, oxígeno 5% y dióxido de carbono 5%). También se realizó el medio de lavado el cual fue colocado a una temperatura de 38.5 °C. Luego, se retiraron los ovocitos del medio de fertilización y fueron pasados por gotas de medio de lavado, donde se desnudaron completamente y se pasaron las gotas de medio de cultivo.

Los probables embriones estuvieron en cultivo durante 7 días, haciendo un recambio del 50% del medio de cultivo el día 3 donde se retiraron 50 μ L del medio SOF 1 y se cambiaron por 50 μ L de SOF 2, en el día 5 del cultivo se realizó un nuevo recambio con el fin de que en este punto la gota fue 100% SOF 2. Durante esta etapa del proceso se realizó la evaluación de la tasa de clivaje a los 3 días y la producción final de blastocistos a los 7 días de cultivo.

5.8 Evaluación de la tasa de clivaje y producción de blastocistos.

Para determinar la tasa de clivaje, a las 48 h de cultivo en cada grupo experimental se contabilizó el porcentaje de estructuras que presentaron división celular con respecto al número de ovocitos colocados en maduración.

A los 8 días de cultivo se determinó la tasa de Blastocistos teniendo en cuenta el porcentaje de embriones que alcanzaron el estado de blastocisto con respecto al número de ovocitos que iniciaron el proceso de FIV y de cultivo.

5.9 Diseño experimental

Experimento 1. Evaluación de la tasa de Recuperación, calidad morfológica y competencia nuclear y citoplasmática de ovocitos recuperados de ovarios provenientes de ovejas monovulatorias, poliovulatorias y anaovulatorias.

Durante este experimento se evaluó la cantidad de ovocitos o tasa de recuperación, la competencia ovocitaria medida por la calidad morfológica de los CCOs obtenidos y la tasa de maduración nuclear, esta última evaluada indirectamente a través de la tasa de clivaje y producción de blastocistos.

Experimento 2. Evaluación del efecto de la presencia del cuerpo lúteo, sobre la tasa de recuperación ovocitaria, la calidad morfológica de los ovocitos, la cinética de la maduración nuclear y la tasa de clivaje y producción de blastocisto.

Con el objetivo de evaluar el efecto del cuerpo lúteo (CL), los ovarios provenientes de ovejas monovulatorias, poliovulatorias y anaovulatorias fueron individualizados.

5.10 Análisis estadístico

Para las diferencias en la progresión de maduración y clasificación ovocitaria se utilizó la prueba estadística de Chi-cuadrado, y para la tasa de recuperación se utilizó el test de múltiple comparación Kruskal-Wallis. Empleando el programa estadístico Graphpad Prism[®] (versión 8.0.2), con un valor de $P (< 0.05)$.

La asociación del porcentaje de clivaje y el porcentaje de blastocisto de los ovocitos de calidad 1-2 recuperados en los grupos experimentales ovarios (M+, M-, P+, P- o NCL). Para este experimento las variables respuesta fueron de tipo discreto con dos opciones (clivaje positivo o

negativo, y blastocisto positivo o negativo). Se empleó el modelo generalizado binomial mixto con efectos fijos dados por los grupos experimentales, y con efecto aleatorio dado por la colecta, donde los grupos experimentales, y el efecto aleatorio corresponde al efecto de la colecta. Las comparaciones múltiples se llevaron a cabo en la escala exponencial, lo que permitió realizar comparaciones múltiples entre los chances de pares de grupos experimentales. Se probó la hipótesis estadística que la razón de chance entre grupos experimentales era igual a 1, con nivel de significancia del 5%, y ajuste por comparaciones múltiples utilizando el método de Benjamini-Hochberg.

El análisis del porcentaje de blastocisto se llevó a cabo tanto a partir de los ovocitos que iniciaron el proceso de clivaje, como a partir de los ovocitos que alcanzaron a desarrollar clivaje. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software R versión 3.3.1, con los paquetes multcomp, ggplot2, lme4.

6. Resultados y Discusión

6.1 Recuperación y clasificación de ovarios y complejos *cúmulos* ovocitos

Este procedimiento se hizo según la estructuración realizada en la primera fase del proyecto de investigación (Maduración *in vitro*). Para el proceso de fertilización y cultivo *in vitro* se requiere este primer paso.

Se realizaron 19 colectas de ovarios de oveja faenadas en planta de beneficio, de los cuales se utilizaron 276 pares de ovarios y se recuperaron 1566 CCOs para la maduración y fertilización *in vitro*, donde se obtuvo un promedio 2.8 ovocitos recuperados por ovarios. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Recuperación y clasificación de ovarios y complejos *cúmulus* ovocitos para la estandarización de los procesos de fertilización y cultivo *in vitro*.

| Grupo | Número de ovarios | Total, número de CCOs | %de ovocitos recuperados / ovario |
|--------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| P- | 86 | 255 | 3,0 |
| P+ | 223 | 554 | 2,5 |
| M- | 93 | 290 | 3,1 |
| M+ | 99 | 271 | 2,7 |
| NCL | 51 | 196 | 3,8 |
| Total | 552 | 1566 | 2,8 |

Esta tabla presenta el porcentaje de CCOs por ovario de 19 colectas de los grupos experimentales para la estandarización de los procesos de fertilización *in vitro* y cultivo *in vitro*.

Fuente: Elaboración propia

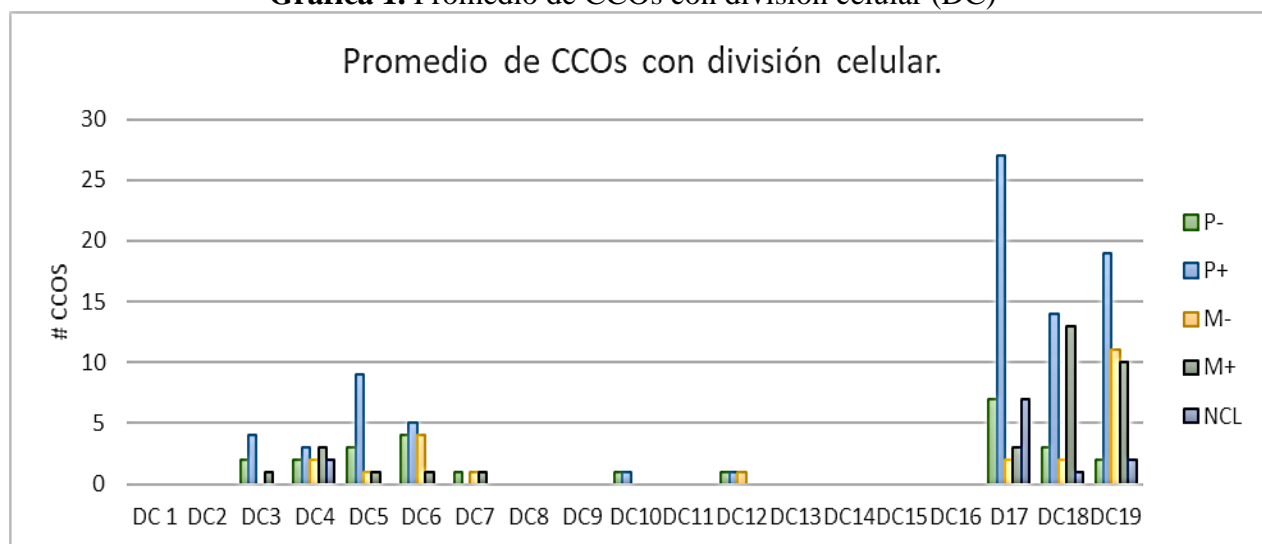
El mayor porcentaje de ovocitos recuperados lo obtuvo el grupo NCL con un 3,8% y el menor porcentaje de ovocitos recuperados fueron los grupos P+ y M+, esto podría deberse al

abarcamiento que hace el cuerpo lúteo en el ovario presentado baja población folicular. Experimentos realizados por Moreno (20) encontró que la mayor tasa de recuperación fue de las vacas no cíclicas que no tenían presencia de CL en los ovarios, referenciando que la irrigación sanguínea no es uniforme en los ovarios con CL por que la funcionalidad de esta estructura exige mayor aporte sanguíneo (14), reafirmando que en los ovarios con ausencia de cuerpo lúteo (NCL) el flujo sanguíneo se distribuye más homogéneamente y el suplemento de gonadotropinas que surgen de origen hipofisiario y los factores de crecimiento producidos localmente y que son indispensables para el crecimiento folicular aumentan favoreciendo el incremento de folículos en el ovario. (85)

6.2 Fertilización *in vitro* y gradientes de PERCOLL

Resultados y análisis del porcentaje de división celular o clivaje y el desarrollo de blastocisto a partir de ovocitos recuperados de las ovejas poliovulatorias y monovulatorias.

Para la realización de este proceso se hicieron varios trabajos experimentales, utilizando medios de cultivo para fertilización *in vitro*, teniendo como base los medios ya estandarizados en la producción de embriones *in vitro* de bovinos del laboratorio de Reproducción animal de la universidad. (Ver grafica 1).

Gráfica 1. Promedio de CCOs con división celular (DC)

Esta gráfica presenta el número de CCOs que presentaron división celular para cada uno de los trabajos realizados y los respectivos grupos experimentales: P- ovarios poliovulatorios sin CL, P+ ovarios poliovulatorios con CL, M- ovarios monovulatorios sin CL, M+, ovarios monovulatorios con CL, NCL, ovarios anovulatorios de ovarios sin CL.

Fuente: Elaboración Propia

Se usaron los medios base de la FIV en bovinos, medio de IVF-SOF-BSA, suplementado con 20uL de PHE (D-penicilina 20uM, hipotaurina 100uM, epinefrina 1uM) y 20 uL de heparina (20mg/ml) y también se prepararon los gradientes de Percoll con solución Talp libre de calcio 10X y Talp de lavado para formar las columnas de 90%, 60% y 30%, protocolo estandarizado en el laboratorio de reproducción animal de la Universidad Cooperativa de Colombia (86). Esto se manejó en el trabajo 1 y 2 en los cuales observamos que no tuvimos ningún resultado.

Seguido de esto se iniciaron procesos de estandarización y prueba para mejorar los resultados obtenidos en el trabajo 1 y 2 en el cual se agregó al medio de fertilización antes mencionado cloruro de calcio y se hizo una modificación de las columnas de percoll variando de 90% y 45% de gradientes más utilizados en los procesos del lavado de semen en la bibliografía encontrada. (87)

Estos procesos se manejaron en los trabajos 3 y 4 donde podemos observar un proceso de división celular, aunque poco mejorando los primeros experimentos. Seguido de esto se hicieron

modificaciones en las centrifugaciones del percoll teniendo entonces finalmente 9000 RPM por 6 minutos y 5500 RPM por 45 segundos lo que nos muestra mejores resultados en el trabajo 5.

Al hacer la evaluación de los medios FIV utilizados, se observó que el medio estandarizado en el laboratorio, fue eficiente para los procesos de FIV en ovejas. Del total de trabajos realizados, se tomaron 5 experimentos con el objetivo de lograr la estandarización de los procesos de fertilización, en los que se evaluaron diferentes grupos y tratamientos, que permitieran llegar a tal fin. La gráfica 1 evidencia que esta evaluación mostró los mejores resultados con respecto a la división celular se obtuvieron haciendo uso de un medio de fertilización *in vitro* compuesto por IVF SOF-BSA (fluido oviductual sintético – albúmina sérica bovina), HEPARINA y PHE, al cual se le añadió Cloruro de Calcio (CaCl_2 252 mg en 10 ml de agua ultrapura), y los gradientes de densidad (Percoll) con tres columnas de 90%, 60% y 30%, a las cuales se les realizó dos centrifugaciones, la primera 9000 RPM por 6 minutos, y la segunda a 5500 RPM por 45 Seg. logrando así la estandarización final del proceso. Esta metodología fue similar a la empleada por Wan, et al. (88), sin embargo, en su estudio el gradiente Percoll fue de dos columnas (45% y 90%) y centrifugando durante 15 min a $1000 \times g$ a temperatura ambiente y la segunda centrifugación fue a $700 \times g$ durante 5 min. Estas mismas concentraciones de gradiente de Percoll y las respectivas centrifugaciones, fueron manejadas por Souza-Fabjan, et al. (89)

De manera distinta, en el estudio de, dos Santos-Neto, et al. (90) el medio de fertilización consistió en fluido de oviducto sintético (SOF) suplementado con 2% de suero de oveja en estro, $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ de heparina e $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ de Hipotaurina. Sin embargo, tanto este proceso como el aplicado en la presente investigación, son consistentes de acuerdo con Paramino & Izquierdo (91) en cuyo estudio mencionan que la heparina es la mayormente utilizada por los laboratorios para

capacitar a los espermatozoides, así mismo que las condiciones utilizadas para la FIV se realiza habitualmente en medio SOF.

De manera general, se ha observado que los medios más comunes en la producción *in vitro* de embriones de rumiantes son SOF, KSOM y CR1, y SOF es el medio más popular para el cultivo de embriones ovinos de FIV y que la suplementación de los medios de cultivo de embriones de rumiantes con BSA y FBS se utiliza ampliamente para mejorar competencia de desarrollo de embriones de FIV (88). En este sentido, estudios como el de Hajariana, Aghaz, & Karami-Shabankareha (92) han evaluado suplementos alternativos para reemplazar el suero durante la PIVE, en su estudio, fueron usadas diversas concentraciones de sericina para la maduración de ovocitos o el cultivo *in vitro* de embriones ovinos en un intento por establecer un sistema de cultivo más definido y eliminar la variabilidad y los atributos perjudiciales del suero en cultivo. Encontrando que la suplementación de KSOM-aa con 0,5% de sericina proporciona tasas de desarrollo de blastocistos similares a las de la suplementación con suero. Sin embargo, no se han evidenciado cambios en las concentraciones gradientes de densidad (Percoll) siendo las columnas a 45% y 90% las comúnmente utilizadas, hasta el momento no se ha encontrado evidencia de trabajos con las concentraciones manejadas en la presente investigación (90%, 60% y 30%).

El manejo del medio de cultivo desde el trabajo 1 al 7 se realizó con bolsas de cierre hermético a la cual se le hacía inyección de gas patrón y se le daba la respectiva humedad y temperatura. En los trabajos 8 al 16 se realizaron los trabajos en la incubadora de gas patrón (PLANNER) la cual es específica para el cultivo *in vitro* en ovinos.

En el cultivo *in vitro* y acoplándonos a las necesidades de estas células que requieren un manejo con Gas patrón: (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂) (22), se utilizaron bolsas con cierre hermético las cuales fueron ajustadas de manera adecuada para poder introducir el gas dentro de ellas y poder

darles el ambiente requerido se trabajó a temperatura de 38.5°C, humedad de más del 90% y los embriones estuvieron en cultivo durante 7 días.

Se puede observar que los trabajos realizados con esta incubadora mostraron resultados totalmente negativos en comparación con los trabajos anteriormente realizados en bolsas de cierre hermético en el proceso de FIV, esto debido a que la incubadora mostro fallas en la entrada de gas y su configuración general, pudimos observar que las células entraban en proceso de apoptosis debido a la falta significativa en las condiciones requeridas para su crecimiento y también logramos diferenciar la falla a la hora del cambio de color por un cambio de pH del medio de cultivo.

De manera similar a nuestro estudio, Sánchez-Ajofrín, et al. (93) manejaron la misma temperatura y concentración de gases (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂) pero, en este estudio en particular los embriones estuvieron en cultivo hasta el día 8 después de la fertilización *in vitro* y los resultados fueron positivos para todos los experimentos realizados. Por otra parte, el proceso de cultivo utilizado por Reza-Ebrahimi, Mara, Parham, & Dattena (94) varió en un 2% las concentraciones de Oxígeno (+2%) y Nitrógeno (-2%), manejando una atmósfera humidificada de 7% O₂, 5% de CO₂ y 88% de N₂, y la temperatura aumentada a 39 °C durante 7 días, obteniendo resultados significativos, adicionalmente aseguran que existen otros detonantes que afectan la producción de embriones *in vitro* y resaltan que estas condiciones son insustituibles.

Tabla 2. Porcentaje tasa de clivaje y blastocisto por grupo experimental

| Tratamiento | Colecta | #Ovarios | Total FIV | División Celular | % Tasa de Clivaje | Blastocisto | % Blastocisto |
|-------------|---------|----------|-----------|------------------|-------------------|-------------|---------------|
| P- | 19 | 85 | 248 | 26 | 10.48% | 0 | 0% |
| P+ | 19 | 219 | 548 | 83 | 15.15% | 1 | 1% |
| M- | 19 | 87 | 275 | 24 | 8.73% | 0 | 0% |
| M+ | 19 | 93 | 262 | 33 | 12.60% | 0 | 0% |
| NCL | 15 | 49 | 178 | 12 | 6.74% | 0 | 0% |

Esta tabla compara los ovarios recolectados en la totalidad de los trabajos realizados, el total FIV y cuantos alcanzaron la división celular para finalmente llegar a la etapa de blastocisto, esto para cada grupo experimental.

Fuente: Elaboración propia

Respecto al porcentaje de la tasa de clivaje, para todos los grupos se realizó una colecta de 19 trabajos exceptuando el grupo NCL que solo se hicieron 15 ya que en todas las colectas no hubo presencia de ovarios sin cuerpo lúteo. De estas colectas el mayor número de ovocitos recuperados y puesto en fertilización *in vitro* se obtuvo del grupo P+ seguido del grupo M-, mientras que el grupo NCL fue el de menor número de ovocitos recuperados. En este orden, el grupo P+ fue el que presentó mayor división celular llegando a un 15,15% de tasa de clivaje. Sin embargo, aunque el grupo M- fue el segundo grupo con mayor número de ovocitos recuperados no se vio reflejado en la tasa de clivaje obteniendo un menor porcentaje que el grupo M+ cuyo FIV fue menor. Finalmente, de todos los trabajos y todos los grupos solo se llegó a obtener un blastocisto del grupo P+ debido al manejo dado en el último trabajo con cocultivo el cual consistió en tomar las células que quedaron en el medio de maduración y colocarlos en el medio de fertilización con los posibles cigotos, los resultados siguen siendo bajos debido a la serie de dificultades antes mencionadas.

7. Conclusiones

En este estudio se encontró que la ciclicidad ovárica en ovejas se encuentra asociada con la tasa de recuperación de CCOs, considerando que los ovarios de oveja pertenecientes a los grupos P+ y M+ que contaban con presencia de más de un cuerpo lúteo presentaron una tasa mayor de recuperación de CCOs con calidad tipo 1 y 2 en comparación con los grupos que no tenían presencia de cuerpo lúteo.

Para la evaluación de la tasa de clivaje se observó que el porcentaje fue más alto en los grupos P+ y M+ en comparación con los demás grupos, demostrando así que la ciclicidad ovárica causa un efecto sobre la competencia de desarrollo ovocitario, afectando también el porcentaje de clivaje y el desarrollo embrionario. Se pudo observar que los ovarios con presencia de CL pueden ser un componente importante para los resultados de la producción de embriones *in vitro*.

Se evidenció que, para la producción de embriones *in vitro* es necesario el manejo de ambientes controlados y de condiciones exactas requeridas por las células especialmente en el cultivo *in vitro* en ovinos ya que los posibles cigotos deben tener un ambiente con la presencia de Gas patrón: (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂), mejorando así los resultados para la evaluación de la tasa de clivaje de manera significativa en comparación con los experimentos en los que no se realizó con este protocolo.

8. Recomendaciones

Considerando los procesos realizados para llevar a cabo el proyecto, se invita a realizar en otros estudios el manejo de ambientes controlados donde se realicen con medios de cultivos totalmente estandarizados y condiciones del laboratorio con todos los parámetros requeridos, también se realicen controles de otras variables que puedan afectar la producción de embriones *in vitro* como la temperatura, edad, estado nutricional y reproductivo de los animales, verificar viabilidad y calidad de material de trabajo brindados por los frigoríficos.

9. Referencias Bibliográficas

1. Agronews Castilla y León. "Beneficios y propiedades de la carne de cordero".
2. FAOSTAT-DATA. Live Animals.
3. Zhu J, Moawad AR, Wang CY, Li HF, Ren JY, Dai YF. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. International Journal of Veterinary Science and Medicine. 2018; p. S15-S26.
4. Viana J. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. The International Embryo Transfer Society (IETS), Data Retrieval Committee.
5. Gonçalves de Souza-Fabjan JM, Panneau B, Duffard N, Locatelli Y, de Figueiredo JR, de Figueirêdo-Freitas VJ, et al. *In vitro* production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. Theriogenology. 2014; p. 1149-1162.
6. Marsico T, de Camargo J, Valente RS, Sudano MJ. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. Animal Reproduction. 2019; p. 423–439.
7. Reader K, Stanton JA, Juengel J. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. Biology (Basel). 2017.
8. Graña-Baumgartner A, Meikle A, Fernández-Foren A, Neimaur K, Barrera N, Cuadro F, et al. Local influence of the corpus luteum on the ipsilateral oviduct and early embryo development in the ewe. Theriogenology. 2020; p. 7-15.
9. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiol Rev. 2000; p. 1-29.
10. Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Ramesh HS, Nandi S. *In vitro* developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. Theriogenology. 2007; p. 882-888.
11. Pirestani A, Hosseini SM, Hajian M, Forouzanfar M, Moulavi F, Abedi P, et al. Effect of ovarian cyclic status on *in vitro* embryo production in cattle. Int J Fertil Steril. 2011; p. 172-175.

12. Gonzalez-Bulnes A, Berlinguer F, Cocero MJ, Garcia-Garcia RM, Leoni G, Naitana S, et al. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances *in vivo* and *in vitro* blastocysts output in sheep. *Theriogenology*. 2005; p. 1392-1403.
13. Contreras-Solis I, Diaz T, Lopez G, Caigua A, Lopez-Sebastian A, Gonzalez-Bulnes A. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. *Anim. Reprod. Science*. 2008; p. 47-55.
14. Shabankareha H, Habibizadb J, Sarsaifia K, Cheghamirzac K, Kazemein V. The effect of the absence or presence of a corpus luteum on the ovarian follicular population and serum o estradiol concentrations during the estrous cycle in Sanjabi ewes. *Small Ruminant Research*. 2010;: p. 180–185.
15. Argudo D, Tenemaza M, Merchán S, Balvoa J, Méndez M, Soria M, et al. Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology*. 2020; p. 232-239.
16. Rizos D, Clemente M, Bermejo- Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez- Adán A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008; p. 44-50.
17. Penitente-Filho J M, Carrascal E, Oliveira FA, Zolini AM, Oliveira C, Costa Soares ÍA, et al. Influence of Dominant Follicle and Corpus luteum on Recovery of Good Quality Oocytes for *In vitro* Embryo Production in Cattle. *Br Biotechnol J*. 2014; p. 1305-1312.
18. Pfeifer LFM, Campos H, Miguel Jr JC, Silveira LL, Schneider A, Correa MN, et al. Aumento da qualidade de ovócitos recuperados por punção folicular de vacas submetidas previamente à superovulação Increasing of oocytes quality retrieved by ovum pick-up from cows previously superovulated.. *Rev. Bras Reprod Anim*. 2011; p. 363-367.
19. Yamamoto T, Iwata H, Goto H, Shiratuki S, Tanaka H, Monji Y, et al. Effect of Maternal Age on the Developmental Competence and Progression of Nuclear Maturation in Bovine Oocytes.. *Molecular Reproduction & Development*. 2010; p. 595–604.
20. Moreno J ER. Efecto del Estatus Ovárico sobre la Producción *in vitro* en Embriones Bovinos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
21. Hajarian H, Shahsavari M, Karami S H, Dashtizad M. The presence of corpus luteum may have a negative impact on *in vitro* developmental competency of bovine oocytes. *Reproductive Biology*. 2016; p. 47-52.

22. Paramino MT, Izquierdo D. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*. 2016; 86(1): p. 152-159.
23. Godke R, Sansinena M, Youngs C. Assisted Reproductive Technologies and Embryo Culture Methods for Farm Animals. *Transgenic Animal Technology (Third Edition)*. 2014; p. 581-638.
24. Chavez-Zapana JD. Efecto del Suero de Oveja Súper Ovulada sobre la Maduración y Fertilización *in vitro* de Ovocitos de Ovino. Tesis de Pregrado. Universidad Nacional del Altiplano - PUNO, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
25. Maalouf WE, Lee JH, Campbell KHS. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology*. 2009; p. 1083-1092.
26. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*. 2010; p. 1741–7899.
27. Khurana N, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*. 2000; p. 741-756.
28. Colonna R, Cecconi S, Buccione R, Mangia F. Amino acid transport systems in growing mouse oocytes. *Cell Biology International Reports*. 1983; p. 1007-1015.
29. Al-Mutary M, Al-Ghadi M, Al-himaidi , A , Iwamoto D, Al-anazi Y, et al. Using RT-PCR and glutathione level to study the effect of follicular fluid on *in vitro* maturation and gene expression of sheep oocytes. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019; p. 1216-1222.
30. Lojkic M, Getz I, Samardzija M, Matkovic M, Bacic G, Karadjole T, et al. Effect of cysteamine supplementation during *in vitro* culture of early-stage bovine embryos on blastocyst rate and quality. *Acta Veterinaria Brno*. 2012; p. 229-234.
31. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006; p. 126-136.
32. Swain JE, Pool TB. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Human Reproduction Update*. 2008; p. 431-446.

33. Labrecque R, Sirard MA. The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. *Molecular Human Reproduction*. 2014; p. 103-116.
34. Krisher R. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*. 2004; p. 14-23.
35. Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Hum Reprod Update*. 2018; p. 245–266.
36. Aguila L, Treulen F, Therrien J, Felmer R, Valdivia M, Smith L. Oocyte Selection for *In vitro* Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals*. 2020.
37. Lonergan P, Fair T. Maduración de ovocitos *in vitro*. *Revisión anual de biociencias animales*. 2016; p. 255-268.
38. Rizos D, Ward F, Duffy PAT, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*. 2002; p. 234-248.
39. Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Current Topics in Developmental Biology*. 2007; p. 21-49.
40. Reader K, Cox N, Stanton JA, Juengel J. Mitochondria and vesicles differ between adult and prepubertal sheep oocytes during IVM. *Reproduction, Fertility and Development*. 2015; p. 513-522.
41. Galloway C, Lee H, Yoon Y. Mitochondrial morphology-emerging role in bioenergetics. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012; p. 2218-2228.
42. Brevini T, Vassena R, Francisci C, Gandolfi F. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 2005; p. 1218-1223.
43. Stojkovic M, Machado S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves P, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction*. 2001; p. 904-909.

44. Lee HS, Ma H, Cervera R, Tachibana M, Sparman M, Woodward J, et al. Rapid mitochondrial DNA segregation in primate preimplantation embryos precedes somatic and germline bottleneck. *Cells Reports*. 2012; p. 506-515.
45. Wakefield SL, Lane M, Mitchell M. Impaired mitochondrial function in the preimplantation embryo perturbs fetal and placental development in the mouse. *Biology of Reproduction*. 2011;; p. 572-580.
46. Latham KE. Endoplasmic reticulum stress signaling in mammalian oocytes and embryos: life in balance. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2015; p. 227-265.
47. Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and Cellular Biology*. 2006; p. 5688-5697.
48. Penitente-Filho J, Jiménez C, Zolini A, Carrascal E, Azevedo J, Silveira C, et al. Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*. 2015; p. 148-152.
49. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. Ultrasonographic study of the effects of the corpus luteum on antral follicular development in unilaterally ovulating western white-faced ewes. *Animal Reproduction Science*. 2001; p. 231-244.
50. Islam MR, Khandoker MAMY, Afroz S, Rahman MGM, Khan RI. Qualitative and quantitative analysis of goat ovaries, follicles and oocytes in view of *in vitro* production of embryos. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2007; p. 465-469.
51. Quezada-Casasola A, Martínez-Armendáriz KE, Itzá-Ortiz MF, Escárcega-Ávila AM, Pérez-Eguía E, Filipiak Y, et al. Effect of presence of corpora lutea on cumulus expansion of *in vitro* matured bovine oocytes selected by trypan blue and brilliant cresyl blue tests. *Journal of Applied Animal Research*. 2018; p. 967-972.
52. Peralta-Torres J, Aké-López J, Segura-Correa J, Aké-Villanueva J. Effect of season on follicular population, quality and nuclear maturation of bovine oocytes under tropical conditions. *Animal reproduction science*. 2017; p. 47-53.
53. Abdelnaby EA, Abo El-Maaty AM, Ragab RSA, Seida AA. Dynamics of uterine and ovarian arteries flow velocity waveforms and their relation to follicular and luteal growth and blood flow vascularization during the estrous cycle in Friesian cows. *Theriogenology*. 2018; p. 112-121.

54. Shabankareh HK, Kor NM, Hajarian H. The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal reproduction science*. 2013; p. 109-114.
55. Quezada-Casasola A, Roldán-Domínguez HP, Cano-Reagan DE, Escárcega-Ávila AM, Itza-Ortiz MF, Carrera-Chávez J, et al. Corpora lutea affect *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes and embryonic development after fertilization with sex-sorted or conventional semen. *Tropical Animal Health and Production*. 2020; p. 3493–3499.
56. Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. 2002; p. 1523-1532.
57. Annes K, Müller D, Vilela JA, Valente RS, Caetano DP, Cibin FW, et al. Influence of follicle size on bovine oocyte lipid composition, follicular metabolic and stress markers, embryo development and blastocyst lipid content. *Reproduction, Fertility and Development*. 2019; p. 462-472.
58. Alves GP, Cordeiro FB, de Lima CB, Annes K, dos Santos ÉC, Ispada J, et al. Follicular environment as a predictive tool for embryo development and kinetics in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 2019; p. 451-461.
59. Tan JH, Wang HL, Sol XS, Liu Y, Sui HS, Zhang J. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 2009; p. 1-9.
60. Quan GB, Wu GQ, Wang YJ, Ma Y, Lv CR, Hong QH. Meiotic maturation and developmental capability of ovine oocytes at germinal vesicle stage following vitrification using different cryodevice. *Cryobiology*. 2016; p. 33-40.
61. Cecconi S, Mauro A, Capacchietti G, Berardinelli P, Bernabò N, Di Vincenzo A, et al. Meiotic maturation of incompetent prepubertal sheep oocytes is induced by paracrine factor(s) released by gonadotropin-stimulated oocyte-cumulus cell complexes and involves mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 2008; p. 100-107.
62. De Wit AAC, Wurth YA, Kruip TA. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of animal science*. 2000; p. 1277-1283.

63. McKeegan PJ, Sturmey RG. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*. 2011; p. 59-67.
64. Sturmey R, Reis A, Leese H, McEvoy T. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009; p. 50-58.
65. Dadarwal D, Honparkhe M, Dias FCF, Alce T, Lessard C, Singh J. Effect of superstimulation protocols on nuclear maturation and distribution of lipid droplets in bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*. 2015; p. 1137-1146.
66. Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction*. 2014; p. R15-27.
67. Salamone DF, Canel NG, Rodríguez MB. Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals. *Reproduction*. 2017; p. F111-F124.
68. Nagano M. Acquisition of developmental competence and *in vitro* growth culture of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 2019.
69. McEvoy T, Coull G, Broadbent P, Hutchinson J, Speake B. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*. 2000; p. 163–170.
70. Genicot G, Leroy J, Soom A, Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*. 2005; p. 1181–1194.
71. Kim J, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Reproduction*. 2001; p. 131–138.
72. Su Y, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien M, Affourtit J, Pangas S, et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*. 2008; p. 111–121.
73. Zhu J, Moawad AR, Wang CY, Li HF, Ren JY, Dai YF. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2018; p. S15-S26.
74. Mara L, Sanna D, Casu S, Dattena M, Muñoz IM. Blastocyst rate of *in vitro* embryo production in sheep is affected by season. *Zygote*. 2014.

75. Shi JM, Yi JY, Tian XZ, Wang F, Lian ZX, Han HB, et al. Effects of seasonal changes on the ovulation rate and embryo quality in superovulated Black Suffolk ewes. *Neuroendocrinology Letters*. 2015.
76. Ahmadi E, Nazari H, Hossini-Fahraji H. Low developmental competence and high tolerance to thermal stress of ovine oocytes in the warm compared with the cold season. *Tropical Animal Health and Production*. 2019; p. 1611–1618.
77. Hansen P. Reproductive physiology of the heat-stressed dairy cow: implications for fertility and assisted reproduction. *Animal Reproduction*. 2019; p. 497-507.
78. Paes V, Vieira L, Correia H, Sa N, Moura A, Sales A, et al. Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus-oocyte complex. *Theriogenology*. 2016; p. 994-1003.
79. Roth Z. Stress-induced alterations in oocyte transcripts are further expressed in the developing blastocyst. *Molecular Reproduction and Development*. 2018; p. 821-835.
80. Pérez R, Cruz U, Avendaño-Reyes L, Correa-Calderón A, López-Baca M, Lara-Rivera A. Heat stress impacts in hair sheep production. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2018.
81. Iwata H, Goto H, Tanaka H, Sakaguchi Y, Kimura K, Kuwayama T, et al. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*. 2011; p. 424-432.
82. Armstrong D. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*. 2001; p. 1303-1322.
83. Ptak G, Matsukawa K, Palmieri C, Della Salda L, Scapolo PA, Loi P. Developmental and functional evidence of nuclear immaturity in prepubertal oocytes. *Human Reproduction*. 2006; p. 2228-2237.
84. Rodríguez-Cornejo WF. Estandarización de Procesos para la Producción *in vitro* de Embriones Ovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal en el Centro Académico Guatiguará-Piedecuesta. Tesis de Pregrado. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
85. Kaczmarek M, Schams D, Ziecik A. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology – an overview. *Reprod Biol*. 2005; p. 111-136.

86. García-Arévalo J, Restrepo-González S, Gómez-Sánchez N, Moreno-Jerez E, Dubeibe-Marín D, Mogollón-Waltero E. Manual de Procedimientos para la Producción y Vitricación de Embriones Bovinos en Laboratorios de Reproducción Animal. Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA, Universidad Cooperativa de Colombia - UCC.
87. Hernández Pichardo JERSJL, Sánchez Martínez C, Ramírez Franco R. Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos. *Revista de Salud Animal*. 2015; p. 15-20.
88. Wan Pc, Hao Zd, Zhou P, Wu Y, Yang L, Cui Ms, et al. Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Animal Reproduction Science*. 2009; p. 279-288.
89. Souza-Fabjan JM, Locatelli Y, Duffard N, Corbin E, Touzé JL, Perreau C, et al. *In vitro* embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up–derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. *Theriogenology*. 2014; p. 1021-1031.
90. dos Santos-Neto PC, Vilariño M, Cuadro F, Barrera N, Crispo M, Menchaca A. Cumulus cells during *in vitro* fertilization and oocyte vitricación in sheep: Remove, maintain or add? *Cryobiology*. 2020; p. 161-167.
91. Paramino T, Izquierdo D. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*. 2016; p. 152-159.
92. Hajariana H, Aghaz F, Karami-Shabankareha H. Replacement of serum with sericin in *in vitro* maturation and culture media: Effects on embryonic developmental competence of Sanjabi sheep embryo during breeding season. *Theriogenology*. 2017; p. 144-148.
93. Sánchez-Ajofrín I, Iniesta-Cuerda M, Sánchez-Calabuig M, Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Ortiz J, et al. Oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation and fertilization affects embryo quality in sheep and deer. *Anim Reprod Ciencia*. 2020.
94. Reza-Ebrahimi M, Mara L, Parham A, Dattena M. Reduced effect of mineral oil toxicity using four-well culture dish in sheep embryo production. *Small Ruminant Research*. 2020.