

BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN DEL MEDIO DE MADURACIÓN IN VITRO SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO DE OVOCITOS BOVINOS. Liz Greyli Rosell Viloría, Zeylin del Carmen Millano Bracho, Francisco Báez Contreras, Patricia Villamediana Monreal, Rumualdo González Fernández.....	6
QUITOSANO COMO COAGULANTE NATURAL DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS CON ALTA TURBIDEZ. Yaxcelys Caldera, Lorena Fuentes, Geraldine Puyosa, Rodolfo Barrera, Iván Mendoza y Yoalis González.....	19
USO DE LAS SEMILLAS DE <i>Moringa oleifera</i> COMO COAGULANTE EN EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES PROVENIENTES DEL LAVADO DE VEHÍCULOS. Alfredo Rincón González, Luisa Saules de Mejías, José Delgado González, Sedolfo Carrasquero Ferrer y Altamira Díaz Montiel.....	31
EVALUACIÓN DE LA PESQUERÍA ARTESANAL DE EL TIRANO, ISLA DE MARGARITA, VENEZUELA, DURANTE LA TEMPORADA DE PESCA ENERO-DICIEMBRE 2012. Leo Walter González, Nora Eslava, Francisco Guevara, Félix Díaz y Juan Miguel Rodríguez.....	43
INSTRUCCIONES A LOS AUTORES.....	58
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS.....	68

Vol.51, N° 1, Abril 2017

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA
PUBLICADA POR LA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA



Efecto de la temperatura de conservación del medio de maduración *in vitro* sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos.

Liz Greyli Rosell Viloría^{1,2}, Zeylin del Carmen Millano Bracho^{1,2}, Francisco Báez Contreras¹, Patricia Villamediana Monreal¹, Rumualdo González Fernández²

Laboratorio de Citogenética¹, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apartado postal 4001, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Laboratorio de Fecundación *In Vitro*², Venezolana de Inseminación artificial y Trasplante de Embriones, C.A., Villa del Rosario, Estado Zulia, Venezuela.

franciscobaez81@gmail.com*

Resumen

Un factor principal que determina las tasas de blastocistos obtenidos con la técnica de producción *in vitro* (PIV) de embriones, es la calidad de los ovocitos. Por tal razón, es necesario proporcionar condiciones adecuadas del sistema de cultivo para que los ovocitos se desarrollen en embriones viables. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura de conservación de un medio comercial de maduración *in vitro* (MIV; TCM-199) sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos mestizos. Los ovocitos fueron recuperados a partir de ovarios de vacas sacrificadas, mediante la técnica de aspiración folicular. Los complejos *cumulus*-ovocito (COCs) seleccionados fueron puestos a madurar en medio de MIV fresco y congelado/descongelado en nitrógeno líquido (N₂L). Los ovocitos madurados se fecundaron *in vitro* (FIV) y luego los presuntos cigotos se cultivaron durante 8 días en medio de fluido oviductal sintético modificado y suplementado con aminoácidos esenciales y no esenciales (mSOFaa) +8 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA). No se observó diferencia estadística entre las tasas de MIV-FIV y la división embrionaria entre ambos tratamientos; contrariamente, se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la producción de blastocistos provenientes de ovocitos madurados en medio fresco vs congelado al día 8 (29,08% vs 13,01% respectivamente). En conclusión, con el medio de MIV congelado se obtiene una adecuada maduración nuclear e igualmente proporciona una tasa de fecundación y de división embrionaria en ovocitos bovinos, similar a la aportada por el medio fresco. Este método debe seguir perfeccionándose para poder llegar a ser una alternativa para los laboratorios de PIV de embriones que requieran simplificar la rutina de trabajo tomando todas las medidas de ahorro posible y cubrir los requerimientos y demanda a gran escala.

Palabras clave: MIV; ovocitos; blastocistos; bovinos; temperatura criogénica.

Effect of *in vitro* maturation medium on development capacity of bovine oocytes.

Abstract

A principal factor determining rates of blastocysts obtained with the technique of *in vitro* production (IVP) embryo is the quality of oocytes. For that reason is necessary to provide adequate conditions of culture system for oocytes to develop into viable embryos. The purpose of this study was to evaluate the effect of temperature preservation of a commercial medium of *in vitro* maturation (IVM; TCM-199) on the development capacity of bovine oocytes. The oocytes were recovered from ovaries of slaughtered cows, using the technique of follicular aspiration. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were selected and placed to mature in both, fresh and freeze/thaw in liquid nitrogen (LN₂) IVM medium. Matured oocytes were fertilized *in vitro* (IVF) and then the presumptive zygotes were cultured for 8 days in modified synthetic oviductal fluid medium supplemented with essential and nonessential amino acids (mSOFaa) + 8 mg/mL bovine serum albumin (BSA). No statistical difference in the rates of IVM-IVF and embryo division between the two treatments was observed. On the contrary, significant differences ($P < 0.05$) were found in the production of blastocysts from oocytes matured in fresh medium vs frozen on day 8 (29.08% vs 13.01% respectively). In conclusion, using frozen medium of IVM an adequate nuclear maturation is obtained of bovine oocytes. It also provides a rate of fertilization and embryo division similar to that provided by the fresh medium. This freezing method should be further improved for to become an alternative for laboratories requiring IVP of embryos simplify routine work taking into consideration all possible savings measures and meet the requirements and demand at a large-scale.

Key words: IVM, oocytes, blastocyst, bovine, cryogenic temperature.

Introducción

La producción *in vitro* de embriones bovinos ha sido ampliamente mejorada, particularmente en estos últimos años (Momozawa y Fukuda 2011). A pesar de haberse superado muchas dificultades que se presentaron en el desarrollo inicial de ésta técnica, muchos laboratorios han sido capaces de producir eficientemente embriones *in vitro* (Meirelles *et al.* 2004). Estos embriones se caracterizan por presentar un desarrollo y calidad inferior que los obtenidos *in vivo*. El bajo rendimiento en la MIV de ovocitos constituye, un factor limitante en la PIV de embriones (Ruiz y Astiz 2010, Caínzos 2012). Por lo tanto, la optimización del medio de maduración usado es importante para incrementar la eficiencia de los sistemas de producción (Tareq *et al.* 2013).

La composición de los medios y las condiciones de cultivo constituyen un componente importante que afecta significativamente la MIV, además de los factores moleculares, celulares, y genéticos intrínsecos al ovocito (Christopikou *et al.* 2010). En numerosos laboratorios los medios de cultivo suelen ser comprados al fabrican-

te y sólo en algunos casos son preparados en el mismo laboratorio de PIV. Normalmente, estos medios recién elaborados deben ser guardados a 4°C y usados antes de las dos semanas de su preparación (Palasz y de La Fuente 2007).

Los componentes de los medios de cultivo como el piruvato, los antibióticos y la L-glutamina se degradan espontáneamente durante el almacenaje y por lo tanto deben ser adicionados inmediatamente antes de su utilización. Otros elementos del medio, como los factores de crecimiento y el suero pueden ser alicuotados y congelados a -70°C. Con ésta temperatura se previene el deterioro y la desnaturalización de las proteínas, que producen su insolubilidad al precipitar los componentes del medio (Palasz y de La Fuente 2007).

La congelación constituye una alternativa para el almacenamiento y mantenimiento del medio de MIV durante largos periodos. El nitrógeno puro es un agente frigorígeno en estado líquido que alcanza temperaturas de -196°C a presión atmosférica (Madrid et al. 2003). Ésta capacidad de mantener bajas temperaturas en congelaciones rápidas hace que sea ampliamente utilizado para la conservación de muestras biológicas tales como sangre, esperma, ovarios u otra clase de muestras tisulares, manteniendo inalteradas sus propiedades (González 2014).

Al establecer parámetros de almacenamiento por largos períodos para los medios de MIV utilizando temperaturas criogénicas, se evita la renovación constante de medios, así como la disminución de la inconsistencia de los resultados en las rutinas de trabajo, asociada a la introducción de una gran cantidad de nuevos productos químicos y agua (Oliveira 2006). De ésta manera, se disminuyen los costos económicos relacionados con la producción, facilitando la aplicación de programas comerciales (Palma 2001).

Oliveira 2006, compara medios frescos y congelados (a -80°C hasta 8 semanas) de maduración de ovocitos y de cultivo de embriones, descongelando las alícuotas congeladas a 4-5°C toda la noche antes de ser utilizadas. Es importante resaltar que es la única referencia encontrada con una investigación similar a este trabajo.

Con el propósito de ampliar el tiempo de utilidad del medio de MIV mediante la congelación, y simplificar el procedimiento de la rutina de trabajo en los laboratorios de PIV de embriones, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de conservación a bajas temperaturas de un medio de MIV sobre la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos mestizos hasta el estadio de blastocisto.

Materiales y metodos

Obtención y MIV de ovocitos

Se recolectaron ovarios de vacas mestizas sacrificadas en matadero comercial y transportados al laboratorio en solución salina (0.9% NaCl) + 65 µg/mL de penicilina G potásica (P7794, Sigma) + 50 µg/mL de sulfato de estreptomycin (S041, Caisson Lab.) a 35-37 °C en recipientes isotérmicos en un lapso de 30 min. En el laboratorio, los ovarios se lavaron tres veces con solución salina 0.9% NaCl + 65 µg/

mL de penicilina G potásica (P7794, Sigma) + 50 µg/mL de sulfato de estreptomici-
na (S041, Caisson Lab.) a 35-37°C. Los COCs se recuperaron mediante la aspiración
de los folículos, con ayuda de una jeringa de 18G y suspendidos en medio TCM-199
(M2520, Sigma) suplementado con 2,2 mg/mL de NaHCO₃ (31437, Riedel-de Haën),
50 mg/mL de gentamicina (G1397, Sigma), 25 mM de HEPES (H6147, Sigma), 0,4
mg/mL de BSA (A6003, Sigma) y 11,1 mg/L de heparina (H9399, Sigma). Los COCs
fueron identificados bajo un microscopio estereoscópico, seleccionando aquellos
con mayor tamaño, al menos tres capas completas y compactas de células del *cu-
mulus* y citoplasma homogéneo.

El medio de maduración empleado fue el TCM-199 (M7528, Sigma), suplementa-
do con 11mg/mL de piruvato sódico (PYL01, Caisson Lab.), 10 mg/mL de gentamici-
na (G1272, Sigma), 43,44 mg/L de Ala-Gln (A8185, Sigma), 10µg/mL de Folltropin-V®
(Bioniche), 10mg/mL de Pregnyl® (Schering-plough), 1µg/mL de 17β-estradiol (E-
2758, Sigma) y 10% de FCS (S4135, Sigma). Alícuotas de este medio se almacenaron
en crioviales de 1,5 mL y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Cada
criovial fue descongelado a temperatura ambiente. Tanto el medio fresco como
el congelado fueron equilibrados durante 3 horas antes de utilizarse en atmósfera
con 5% de CO₂ en aire saturado de humedad. Los COCs fueron cultivados en grupos
de 10 en placas de Petri de 35 x 10mm en gotas de 100 µL cubiertas con aceite mi-
neral (M3516, Sigma), durante 24 h a 39°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire
saturado de humedad.

Fecundación *in vitro*

Una vez descongelada la pajueta (0,5 mL) a 37°C por 30 s, 100 µL de semen
de un toro de fertilidad conocida, fueron depositados sobre el gradiente de dos
niveles de 90% y 45% de BoviPure™ (ET-AA102-UC/01, Nidacon) diluido en medio
Fert-TALP contenido en un tubo eppendorf a temperatura ambiente (Folchini et
al. 2012). A continuación, se centrifugó a 1.677xg durante 5 minutos en centrifuga
de microtubos (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con el propósito de sedimentar
los espermatozoides viables. Luego se descartó el sobrenadante dejándose un pel-
let de 100µL que se colocó en 900µL de medio TL-FIV y se centrifugó a 1.677 xg
durante 5 minutos.

Finalmente, se dejó un pellet de 100 µL aproximadamente, al cual se le de-
terminó la concentración espermática mediante una cámara de Neubauer hasta
alcanzar una concentración final de 1x10⁶ espermatozoides por mL. Los COCs ma-
durados fueron lavados tres veces en el medio TL-FIV, para luego ser trasladados a
placas de petri de 35x10mm, en grupos de 30 estructuras a gotas de 100 µL de me-
dio TL-FIV suplementado con 10µg/mL de heparina (H3149, Sigma) cubiertas con
aceite mineral (M3516, Sigma). Los COC's y los espermatozoides fueron cultivados
durante 18 h a 38,5°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire saturado de humedad.

Cultivo *in vitro* de embriones

La remoción de las células del *cúmulus* y los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos se realizó mediante agitación mecánica en medio TCM-199. A continuación, los presuntos cigotos fueron lavados 3 veces en ese mismo medio y una vez en el medio de cultivo, antes de ser depositados, en grupos de 10 en placas de petri de 35x10mm en gotas de 100µl de mSOFaa y 8 mg/mL de BSA (A8806, Sigma) según lo descrito por Holm et al. (1999). Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral (M3516, Sigma) e incubadas a 38,5°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire saturado de humedad durante 8 días.

Valoración de los Resultados:

1.- Progresión meiótica:

Para evaluar el grado de maduración, los ovocitos fueron desnudados de sus células del *cúmulus* mediante agitación mecánica y fijados en una mezcla de metanol (32213, Riedel-de Haën)-ácido acético (9507-03, Baker Analyzed) en proporción 3:1 durante 48 h a 4°C. Luego se procedió a teñirlos con aceto-orceína (OR00200025, Scharlau) al 1,1%, evaluando bajo microscopio óptico (400X) la maduración nuclear y clasificándolos según el estadio meiótico: maduros (Metafase II + corpúsculo polar y telofase I) o inmaduros (anafase I, metafase I, condensación cromosómica y vesícula germinal (VG)). Aquellos ovocitos que no pudieron ser incluidos en ninguno de los grupos anteriormente nombrados se clasificaron como degenerados.

2.- Evaluación de la fecundación *in vitro*:

La tasa de fecundación fue determinada tomando en cuenta la penetración de los ovocitos por los espermatozoides, tras 18 h de co-cultivo. Una muestra de ovocitos de todas las placas de fecundación fue tomada, para ser fijadas en una mezcla de etanol (32221, Sigma) - ácido acético (9507-03, Baker Analyzed) en proporción 3:1 durante 48 h a 4°C. Los ovocitos después de ser teñidos con aceto-orceína al 1,1%, fueron considerados como penetrados cuando al menos una cola de espermatozoide se encontró en su citoplasma, y siendo clasificados como:

a.- Normalmente fecundados (2PN+C): cuando en el citoplasma de los cigotos se observaron 2 pronúcleos, uno femenino y otro masculino, y una cola de espermatozoide o bien, una cabeza de espermatozoide descondensándose acompañada de su cola y de un pronúcleo femenino.

b.- Asincrónicos: en este grupo, aquellos ovocitos que fueron penetrados solamente por un espermatozoide, pero se observó alguna alteración o retraso marcado en la formación de los pronúcleos, como la cabeza del espermatozoide no descondensada o una telofase II.

c.- Polispérmicos (>2PN): los cigotos en los que se observaron más de 2 pronúcleos en su citoplasma y los dos corpúsculos polares, más de dos cabezas de espermatozoides descondensándose o más de dos colas en su citoplasma.

3.- Evaluación de la división y desarrollo embrionario:

La tasa de división embrionaria se evaluó a las 72 horas post inseminación (hpi), tomando en cuenta el total de embriones de 2 o más células en relación al total de ovocitos puestos a fecundar. Después de 7 y 8 días de cultivo, los embriones fueron observados bajo microscopio estereoscópico (Olympus, SZX12, Japón).

4.- Análisis Estadístico:

Los resultados obtenidos de las tasas de maduración, fecundación, división embrionaria y de blastocistos fueron expresados como frecuencias y analizados mediante el test de χ^2 del paquete estadístico SAS®. Las diferencias entre las frecuencias se consideraron significativas para valores de $P < 0,05$.

Resultados

Un total de 1.074 ovarios fueron procesados, de los cuales se obtuvieron 3.048 COCs seleccionados como aptos para la MIV, para un promedio de 3,37 COCs por ovario. En la Tabla 1, se muestran los resultados de la progresión meiótica de COCs bovinos MIV. De los ovocitos madurados en el medio fresco, se evaluaron 159 COCs obteniendo una tasa de maduración de 72,32%; mientras que, para el medio congelado se evaluaron 157 COCs de los cuales 73,88% fueron ovocitos maduros, sin diferencias ($P > 0,05$; Fig. 1 y 2).

Tabla 1. Progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en medio de maduración fresco y congelado.

Nº de COCs	Nº de ovocitos maduros			Nº de ovocitos inmaduros				Nº de Deg.	
	Telo I	MII+CP	Total	Ana I	MI	CCII	VG		Total
Totales	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Evaluados	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
MIV FRESCO 159	0 (0)	115 (72,32)	115 (72,32)	0 (0)	21 (13,20)	5 (3,14)	1 (0,62)	27 (16,98)	17 (10,69)
MIV FRESCO 159	1 (0,63)	115 (73,24)	116 (73,88)	1 (0,63)	16 (10,19)	1 (0,63)	0 (0)	18 (11,46)	23 (14,64)

Telo I: telofase I. MII: metafase II. AnaI: anafase I. MI: metafase I. CCII: condensación cromosómica II. Nº de Deg: Ovocitos degenerados. COCs: Complejos *cumulus*-ovocitos.

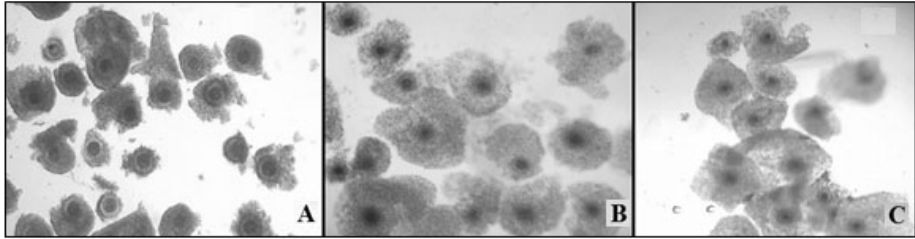


Figura 1. (A) Ovocitos bovinos inmaduros, (B) Ovocitos bovinos MIV con medio fresco, y (C) ovocitos bovinos MIV con medio congelado. Aumento 50X.

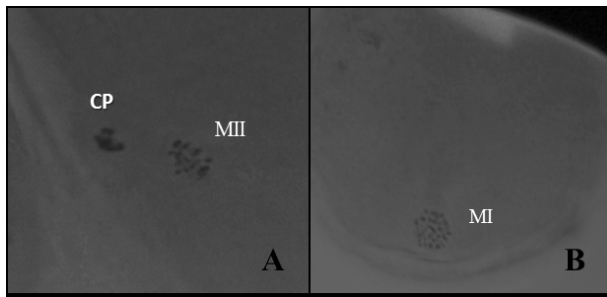


Figura 2. Progresión meiótica de ovocitos bovinos madurados *in vitro* (400X): (A) MII+CP, (B) MI.

Para determinar la tasa de fecundación (Tabla 2), se evaluaron 149 presuntos cigotos cultivados en medio de maduración fresco, lográndose una tasa de penetración de 66%. Con respecto a los presuntos cigotos cultivados en medio de maduración congelado, se evaluaron 179, de los cuales se obtuvo una tasa de penetración de 67,03%, sin diferencias entre ambos grupos ($P > 0,05$; Fig. 3).

Tabla 2. Tasa de fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en medio de maduración fresco y congelado.

Nº de COCs	Ovoc. No Penet.	Ovoc. Penet. Normales	Ovoc. Penet. Anormales				Deg.
			Telo II	Asin.	> 2 PN	TotalOvoc. P	
Evaluados	n	n	n	n	n	n	n
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
MIV FRESCO 149	25 (16,66)	66 (44)	4 (2,66)	21 (14)	8 (5,33)	99 (66)	25 (16,66)
MIV CONGE- LADO 172	32 (17,87)	78 (43,57)	1 (0,55)	35 (19,55)	6 (3,35)	120 (67,03)	27 (15,08)

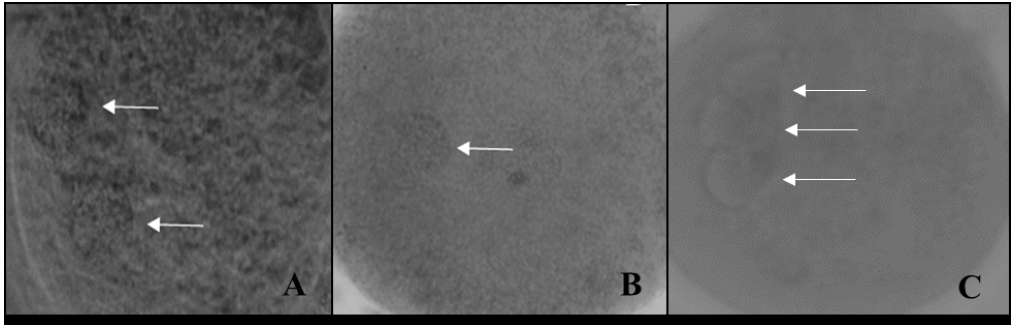


Figura 3. Valoración de la fecundación *in vitro* (400X): ovocitos penetrados: (A) 2PN, (B) 1 PN, (C) 3PN.

Un total de 644 presuntos cigotos fueron CIV. Transcurridas 48 h de cultivo se procedió a evaluar la división embrionaria, obteniendo un porcentaje de embriones de 81,37% para el tratamiento de MIV en medio fresco y 76,03% para el medio congelado (Figura 4). En el día 8 de cultivo, la tasa de desarrollo (Tabla 3) alcanzada por los embriones provenientes de ovocitos madurados en medio fresco y congelado fue de 29,08% y 13,01% respectivamente, encontrándose diferencias ($P < 0,05$).

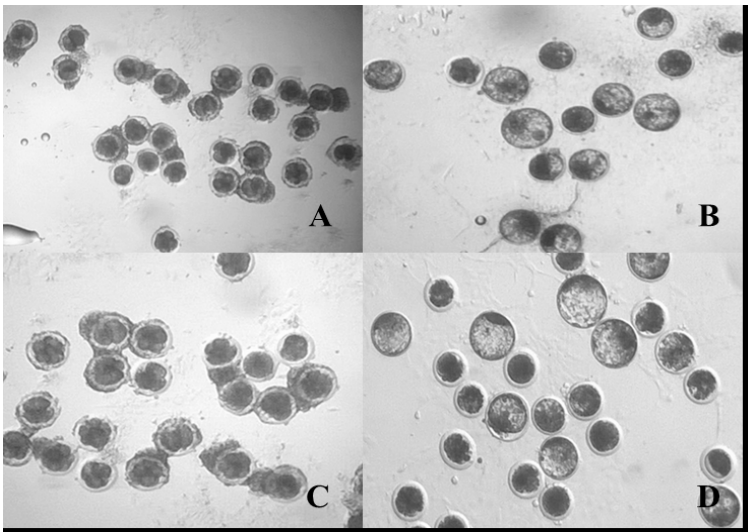


Figura 4. División y desarrollo embrionario (50X): (A) embriones bovinos de 3 días de cultivo y (B) blastocistos expandidos de 6 días de cultivo, procedentes de ovocitos madurados con medio de MIV congelado. (C) Embriones bovinos de 3 días de cultivo y (D) blastocistos expandidos de 6 días de cultivo, procedentes de ovocitos madurados con medio de MIV fresco.

Tabla 3. Evaluación del desarrollo de embriones bovinos PIV.

TCM199	N	Total de divididos día 3 (%)	Blastocistos día 7 (%)	Blastocistos día 8 (%)
Fresco	306	249 (81,37)	84 (27,45) ^a	89 (29,08) ^a
Congelado	338	257 (76,03)	38 (11,24) ^b	44 (13,01) ^b

N: presuntos cigotos puestos en cultivo

^{a,b}: valores en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente (P<0,05).

Discusión

Actualmente, es más frecuente la utilización de medios almacenados a temperaturas criogénicas para la PIV de embriones bovinos. Las principales ventajas de este método de almacenamiento son: simplificación de la técnica, resultados con mayor repetibilidad, reducción de los costos y una mejor consistencia en los resultados obtenidos en la rutina de laboratorio (Oliveira 2006). Báez et al. (2008), y Báez et al. (2014), reportaron en cada caso una tasa de ovocitos maduros de 61,36% y 65,71%; mientras que Peláez et al. (2012), obtuvieron una tasa de maduración de 55,55% con ovocitos provenientes de hembras mestizas sacrificadas y madurados en medio de maduración fresco.

Resultados de tasas de maduración similares a los obtenidos en este trabajo fueron logrados por Hernández y Hernández (2010), de 72,77%, al igual que Salgado et al. (2013), de 70,3% y Asaf et al. (2014), de 70%. Por su parte, Ahuja et al. (2009), lograron una tasa superior con 89,7% de ovocitos que alcanzaron la metafase II en medio fresco. Cabe destacar, que solo se realizaron comparaciones de este trabajo con otros, en los cuales utilizan medios de maduración fresco, debido a las pocas investigaciones con medios congelados. Estos datos sugieren que el sistema de MIV utilizando medio congelado soporta de manera similar la maduración nuclear de ovocitos bovinos madurados en medio fresco.

Sieren y Youngs (2001), utilizando el gradiente de densidad BoviPure® (Nidicon) para realizar la separación espermática obtuvieron una tasa de penetración de ovocitos de 77,2%, superior a las logradas en este trabajo. Por su parte, Peláez et al. (2012), utilizando un gradiente discontinuo de Percoll® obtuvieron 38% de ovocitos penetrados, resultando inferior al obtenido en esta investigación. Samardzija et al. (2006), comparando diferentes métodos de separación espermática para la FIV, demostraron que el gradiente de densidad BoviPure® incrementó de manera satisfactoria la tasa de movilidad en un 70%.

Valeanu *et al.* (2015), evaluando los parámetros funcionales de los espermatozoides bovinos antes y después de la separación por centrifugación de una sola capa (SLC) usando el gradiente de densidad BoviPure®, encontraron que mejoró significativamente la calidad del semen de toro congelado-descongelado, seleccionando aquellos espermatozoides que eran móviles, y con buena integridad de la membrana.

En cuanto al desarrollo embrionario, Jo *et al.* (2014), después de 48 h de CIV lograron una tasa de división de 71,6%. Así mismo, Guimarães *et al.* (2014), Guimarães *et al.* (2015) y Ancco *et al.* (2015), obtuvieron tasas de división embrionaria similares que oscilan entre el 77%-87%, 78,4%-82,1% y 77,7%-87,9% respectivamente.

Oliveira (2006), evaluando las técnicas de simplificación de la rutina de PIV de embriones bovinos, demostró que no se encontraron diferencias en las tasas de blastocistos ni cambios en la morfología cuando se probaron medios de MIV y de CIV congelados, dando a conocer que la congelación relativamente rápida a -80°C y la descongelación lenta a $4-5^{\circ}\text{C}$ no modifica las propiedades generales del medio, sin causar precipitación o cambios de color en el mismo, después de la descongelación. Esto sugiere que las propiedades biológicas del medio para soportar la MIV y el CIV no fueron modificadas. En la presente investigación se pudo apreciar una diferencia significativa ($P<0,05$) en las tasas de blastocistos derivados de los ovocitos cultivados en medio fresco y congelado (29,08% y 13,01% respectivamente).

Zullo *et al.* (2016), al evaluar el efecto de la administración de L-ergotioneina (antioxidante y aminoácido de origen natural) al medio de CIV en el desarrollo y calidad de blastocistos bovinos, obtuvieron resultados similares al de esta investigación, con valores entre 18,4% y 23,6% de blastocistos cultivados en medio SOFaa + 5% suero bovino adulto (BS, siglas en inglés). Por su parte, Dovolou *et al.* (2014), mostraron una tasa de blastocistos de 30% a los 8 días de cultivo en mSOF + 16 mg/mL de BSA; mientras que Da Costa *et al.* (2015), reportan tasas de blastocistos cultivados en medio SOF + 3 mg/mL BSA +5% SFB que oscilan entre 21% y 41%, al investigar el efecto de la adición de cortisol durante la MIV de ovocitos bovinos. Leivas *et al.* (2011), observaron un incremento en las tasas de blastocistos, mediante la adición de 2% de suero fetal bovino (FCS por sus siglas en inglés), en relación al cultivo con BSA sin la adición de FCS, utilizando ovocitos recuperados por *ovum pick-up* (OPU) provenientes de donadoras *Bos taurus indicus*. Estos autores afirman que empleando una concentración de 2% de suero o asociándolo con BSA no se observó un efecto bifásico por parte del suero sobre la calidad de los blastocistos obtenidos.

El desarrollo de nuevas estrategias para reducir la inconsistencia en los resultados obtenidos en cada una de las etapas de PIV de embriones bovinos se considera fundamental a los efectos de incrementar la eficiencia de esta biotecnología. Consideramos, que los medios congelados constituyen una práctica alternativa para los laboratorios de investigación que requieren reducir gastos de reactivos y tiempo de labor.

Conclusiones

El medio de maduración congelado/descongelado aporta tasas de MIV y FIV similares a las del medio de maduración fresco. De igual manera, puede soportar la capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos hasta la etapa de blastocisto. Como conclusión, la congelación de medios representa una alternativa para el ahorro de reactivos, tiempo y reducción de los costos económicos.

Literatura citada

- AHUJA, C., F. MONTIEL, P. PÉREZ Y J. GALLEGOS. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*. 27: 277-284.
- ANCCO, E., D. DIPAZ, C. QUISPE, K. ORIUNDO Y E. MELLISHO. 2015. Desarrollo de embriones bovinos *in vitro* después de la fecundación de ovocitos usando semen de diferentes toros. *Spermova*. 5:129-133.
- ASAF, S., G. LEITNER, O. FURMAN, Y. LAVON, D. KALO, D. WOLFENSON Y Z. ROTH. 2014. Effects of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reproduction*. 147:33-43.
- BÁEZ, F., L. HERNÁNDEZ Y P. VILLAMEDIANA. 2008. Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. *Revista Científica FCV-LUZ* 18:253-261.
- BÁEZ, F., Y. MÉNDEZ Y P. VILLAMEDIANA. 2014. Complemento cromosómico de embriones bovinos (*Bos Taurus indicus*) producidos *in vitro*. *CIENCIA*. 22:14 – 20.
- CAÍNZOS, J. 2012. Diseño de un medio definido para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos en baja tensión de oxígeno. Tesis Doctoral. Dpto. de Patología Animal, Facultad De Veterinaria De Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 193 pp.
- CHRISTOPIKOU, D., C. KARAMALEGOS, S. DORIZA, M. ARGYROU, P. SISI, S. DAVIES Y M. MASTROMINAS. 2010. Spindle and chromosome configurations of human oocytes matured *in vitro* in two different culture media. *Reproductive Bio Medicine Online* 20:639– 648.
- DA COSTA, N., K. LINS BRITO, P. DI PAULA BESSA SANTANA, M. DA SILVA CORDEIRO, T. VELASCO GUIMARÃES SILVA, A. XIMENES SANTOS, P. DO CARMO DE AZEVEDO RAMOS, S. DO SOCORRO DAMASCENO SANTOS, W. ALLAN KING, M. DOS SANTOS MIRANDA Y O. MITIO OHASHI. 2015. Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Theriogenology*. 85:323-329.
- DOVOLOU, E., E. PERIQUESTA, I. MESSINIS, T. TSILIGIANNI, K. DAFOPOULOS, A. GUTIERREZ Y G. AMIRIDIS. 2014. Daily supplementation with ghrelin improves *in vitro* bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology*. 81:565-571.

- FOLCHINI, N., F. LEIVAS, F. SANTOS, E. SCHWENGBER, D. MARTIN, C. SPIAZZI Y D. BRUM. 2012. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Revista Brasileira De Reprodução Animal*. 36:239-244.
- GONZALEZ, R. 2014. Criogenia cálculo de equipos recipientes a presión. Ediciones Díaz de Santos. pp 5-6.
- GUIMARÃES, A., F. LEIVAS, F. SANTOS, E. SCHWENGBER, A. GIOTTO, C. MACHADO, C. GONCALVES, N. FOLCHINI Y D. BRUM. 2014. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Animal Reproduction Science*. 146: 103–110.
- GUIMARÃES, A., S. PEREIRA, L. LEME Y M. DODE. 2015. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 83:52–57.
- HERNÁNDEZ, A. Y H. HERNÁNDEZ. 2010. Efecto de la suplementación con L-cisteína en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. *Revista Científica FCV-LUZ*. 20:268 – 273.
- HOLM, P., P.J. BOOTH, M.H. SCHMIDT, T. GREVE Y H. CALLESEN. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaaci medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology*. 52:683–700.
- JO, H., J. BANG, S. KIM, B. CHOI, J. JIN, H. KIM, I. JUNG, T. SUH, N. GHANEM, Z. WANG Y I. KONG. 2014. Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and *in vitro* developmental competence. *Theriogenology*. 81:675–682.
- LEIVAS, F., D. BRUM, S. FIALHO, W. SALIBA, M. ALVIM, M. BERNARDI, M. RUBIN Y C. SILVA. 2011. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology*. 75:429–433.
- MADRID, A., J. GÓMEZ-PASTRANA, F. SANTIAGO, J. MADRID Y J. CENZANO. 2003. Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos. Ediciones Mundi-Prensa. pp 57.
- MEIRELLES, F., A. CAETANO, Y. WATANABE, P. RIPAMONTE, S. CARAMBULA, G. MERIGHE, Y S. GARCÍA. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science*. 83:13-20.
- MOMOZAWA, K. Y Y. FUKUDA. 2011. Establishment of an advanced chemically defined medium for early embryos derived from *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 57:681-689.
- OLIVEIRA, D. 2006. Produção *in vitro* de embriões: cultivo de embriões pós-eclosão e criopreservação de meios prontos para uso. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Univ. De Brasília, Brasília, 106 pp.

- PALASZ, A. Y J. DE LA FUENTE. 2007. Cultivo de embriones bovinos: efecto de los medios de cultivo y de los requerimientos fisiológicos sobre la calidad de los embriones producidos *in vitro*. Revista Cría y Salud Bovina. N° 9:36-42.
- PALMA, G. 2001. Biotecnología de la reproducción. Argentina. Ediciones INTA. pp 273.
- PELÁEZ, J., Y. URRIBARRÍ, A. PIRELA, F. BAEZ, P. VILLAMEDIANA Y H. HERNANDEZ. 2012. Influencia de la predominancia racial sobre la competencia de maduración, fecundación y desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos. Ciencias del Agro, Ingeniería y Tecnología 3: 21-42.
- RUIZ, S. Y S. ASTIZ. 2010. Producción *in vitro* de embriones (PIV) en biotecnología de la reproducción bovina. ANEMBE. 88: 25-32.
- SALGADO, R., J. SIMANCA Y O. VERGARA. 2013. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados *in vitro*. Revista Científica FCV-LUZ 23:325-328.
- SAMARDZIJA, M., M. KARADJOLE, I. GETZ, Z. MAKEK, M. CERGOLJ Y T. DOBRANIC. 2006. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. Reproductive Biology and Endocrinology. 4:58:1-7.
- SIEREN, K. Y C. YOUNGS. 2001. Assessment of BoviPure™ for the *in vitro* production of bovine embryos. Beef Research Report. Iowa State University, A.S. EE.UU. Leaflet R 1768, 3 pp.
- TAREQ, K., Q. AKTER, H. TSUJII, M. YAHIA KHANDOKER Y I. CHOI. 2013. Effect of dipeptides on *in vitro* maturation, fertilization and subsequent embryonic development of porcine oocytes. Asian - Australasian Journal of Animal Sciences. 26: 501-508.
- VALEANU, S. D. DRUGOCIU Y P. ROSCA. 2015. Effect of Single layer centrifugation using BoviPure on frozen-thawed bovine sperm during a 6 hours survival test. Romanian Biotechnological Letters. 20:10327-10333.
- ZULLO, G., G. ALBERO, G. NEGLIA, C. DE CANDITIIS, G. BIFULCO, G. CAMPANILE Y B. GASPARRINI. 2016. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. Theriogenology. 85:688-697.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

**BOLETÍN DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Vol.51 N° 1 _____

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en abril de 2017, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve