



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de Isoespintanol y Sericina como suplementos en los medios para la producción *in vitro* de embriones bovinos

Manuela Betancur Restrepo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela Biociencias
Medellín, Colombia

2022

Evaluación de Isoespintanol y Sericina como suplementos en los medios para la producción *in vitro* de embriones bovinos

Manuela Betancur Restrepo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Biotecnología

Director (a):

Z, MV, M.Sc y Ph.D Giovanni Restrepo Betancur

Línea de Investigación:

Reproducción Animal

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biotecnología Animal GIBA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela Biociencias

Medellín, Colombia

2022

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Manuela Betancur.

Manuela Betancur Restrepo

Fecha 22/04/2022

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por permitirme terminar este proceso dándome sabiduría, fortaleza y entendimiento.

A mi familia por su paciencia y ser mi soporte durante toda esta etapa, siendo mi motivación aún en las dificultades, ayudándome a superarme como persona y profesional.

Al Grupo de Investigación en Biotecnología Animal GIBA por hacerme miembro, permitirme llevar a cabo mi ensayo experimental en las instalaciones del laboratorio de embriología en el Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, además por su confianza y colaboración.

A mi director de tesis Giovanni Restrepo Betancur, Profesor Asociado a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por su disposición, apoyo, conocimiento y abrirme las puertas para comenzar este camino de preparación constante en el área.

A los doctores Mónica Marcela Ramírez Hernández y Matteo Duque Rodríguez por su paciencia, apoyo y acompañamiento durante el proceso experimental de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por permitirme finalizar mis estudios, es gratificante y un orgullo hacer parte de esta institución.

A la planta de Beneficio Central Ganadera de Medellín, por permitirme la entrada y suministro de ovarios de hembras faenadas para la elaboración de este trabajo.

Finalmente, a todas aquellas personas que hicieron parte de alguna u otra forma, de este proceso y me ayudaron emocional, laboral y académicamente.

Resumen

Evaluación de Isoespintanol y Sericina como suplementos en los medios para la producción *in vitro* de embriones bovinos

Una de las biotecnologías que ha tenido mayor impacto en la eficiencia productiva de los hatos es la producción *in vitro* de embriones bovinos. Sin embargo, se han encontrado falencias en los componentes utilizados en la preparación de medios en los laboratorios como el suero fetal bovino (SFB), que aunque aumenta la producción de embriones, genera dificultades en la criopreservación de embriones debido a la acumulación de lípidos en el citoplasma. De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se usó la Sericina, una proteína extraída del gusano de seda, como alternativa al SFB. Así mismo, se conoce que el estrés oxidativo genera la alteración del ovocito y las células embrionarias en condiciones *in vitro*, por lo tanto, en esta investigación se empleó el isoespintanol, un antioxidante natural con gran capacidad de neutralización de las especies reactivas de oxígeno, con la finalidad de mejorar el proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos y su tolerancia a la criopreservación. Se aspiraron ovocitos de folículos con tamaño de 3 a 8 mm de ovarios de hembras faenadas. Se seleccionaron los ovocitos viables de calidad 1 y 2, se pusieron en gotas de 100 μ l de medio de maduración y se dejaron durante 22 a 24 horas en condiciones de 38.5°C y 5% de CO₂. Se hicieron tres experimentos distribuidos de la siguiente manera: Primero se realizó la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos con cuatro concentraciones de sericina, 0.1%, 0.5%, 1.0% y 2.5%. Se incluyó un tratamiento control con SFB y luego se seleccionaron las dos concentraciones con mayores tasas de MIV. Para el isoespintanol se evaluaron tres concentraciones hasta la expulsión del primer cuerpo polar: 10 μ M, 20 μ M y 30 μ M. Para el segundo experimento, se seleccionaron las dos concentraciones con mejores resultados, que fueron 0.5% y 1.0%, para la sericina y 10 μ M y 20 μ M para el isoespintanol. Se realizó la MIV bajo seis

tratamientos: T1 (10 % SFB) - control 1, T2 (Sin fuente de proteína) - control 2, T3 (sericina 0,5%), T4 (sericina 1%), T5 (isoespintanol 10 μ M más 10% SFB), y T6 (isoespintanol 20 μ M más 10% SFB). Después de 24 horas se realizó la fecundación *in vitro* durante 18–20 horas, se llevó a cabo la eliminación de las células del cúmulus y finalmente, los posibles cigotos se colocaron en medio de cultivo hasta etapa de blastocistos al día 7. Se obtuvo respuesta positiva en el reemplazo completo del SFB como fuente de proteína en los medios de maduración, obteniéndose mejores resultados con sericina al 1% e isoespintanol con 20 μ M. Para el tercer experimento, se utilizó la misma combinación de las dos concentraciones de sericina e isoespintanol seleccionadas hasta etapa de blastocistos al día 7. Se establecieron tres tratamientos en la MIV: T1 (10% SFB) - control 1, T2 (sin fuente de proteína) - control 2 y T3 (1% de sericina más 20 μ M de isoespintanol). En este último experimento, se encontró que la combinación de ambos componentes no arrojó resultados superiores con respecto a los tratamientos controles. Este trabajo concluye que la sericina podría usarse como fuente de proteína durante la MIV de los ovocitos bovinos, en reemplazo del suero fetal bovino. Así mismo, el isoespintanol puede utilizarse como suplemento antioxidante en los medios de maduración para la producción *in vitro* de embriones bovinos.

Palabras clave: Seguridad alimentaria, Biotecnologías, Reproducción animal, Embriones, Bovinos, Criopreservación.

Abstract

Evaluation of Isoespintanol and Sericin as supplements in media for the in vitro production of bovine embryo

One of the biotechnologies having the greatest impact on the productive efficiency of herds is the in vitro production of bovine embryos. However, shortcomings have been found in the components utilized in the preparation of media in laboratories such as bovine fetal serum (BFS), which, although it increases the production of embryos, it also generates difficulties in the cryopreservation of the embryos due to the accumulation of lipids in the cytoplasm. Considering that, this analysis uses Sericin, a protein extracted from silkworms, as an alternative to BFS. It has been known that oxidative stress generates an alteration to the oocyte and embryonic cells under in vitro conditions, therefore, this research uses isospintanol, a natural antioxidant with a the capacity to neutralize oxygen reactive species, in order to improve the in vitro production process of bovine embryos and its tolerance to cryopreservation. Oocytes from follicles with a size of 3 to 8 mm were extracted from ovaries of slaughtered females. Eligible oocytes with quality 1 and 2 were selected, placed in 100 ul drops of a maturation medium and left for 22 to 24 hours under conditions of 38.5°C and 5% CO₂. Three experiments were completed as follows: First, in vitro maturation ("IVM") of the oocytes was performed with four different concentrations of sericin, 0.1%, 0.5%, 1.0% and 2.5% and a BFS control treatment, then the two concentrations with the highest IVM rates were selected. For isospintanol, three concentrations were evaluated to the expulsion of the first polar body, 0 µM (Control), 10 µM, 20 µM and 30 µM. For the second experiment, the two concentrations with the best IVM results were selected, 0.5% and 1.0% for sericin and 10 µM and 20 µM for isospintanol. The IVM was performed under six treatments: T1 (10% BFS) – control 1, T2 (without protein source) – control 2, T3 (0.5% sericin), T4 (1% sericin), T5 (10 µM isospintanol plus 10% BFS), and T6 (20 uM isospintanol plus 10% BFS). After 24 hours of IVM, in vitro fertilization

was performed for 18-20 hours, the cumulus cells were eliminated and finally, the possible zygotes were placed in a culture medium until day seven. A positive result was obtained in the complete replacement of BFS as a protein source in the maturation media, obtaining better results with 1% sericin and 20 μ M isospintanol. For the third experiment, the same two concentrations of sericin and isospintanol were used to the blastocyst stage on day seven. Three IVM treatments were performed: T1 (10% FBS) – control 1, T2 (without protein source) - control 2, and T3 (1% sericin plus 20 μ M isospintanol). In this last experiment, it was found that the combination of both components did not yield superior results with respect to the control treatments. This work concludes that sericin could be used as a protein source during IVM of bovine oocytes, in replacement of bovine fetal serum. It also concludes that isospintanol can be used as an antioxidant supplement in maturation media for the in vitro production of bovine embryos.

Keywords: Food safety, Biotechnologies, Animal Reproduction, Embryos, Bovines, Cryopreservation.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de tablas	XV
Introducción	1
1. Objetivo General.....	7
1.1 Objetivos específicos	7
2. Marco Teórico.....	9
2.1 Importancia de la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos.....	9
2.2 Crioconservación en la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos.....	10
2.3 Fuentes de proteína en la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos.....	11
2.4 Uso de antioxidantes en la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	12
3. Metodología	15
3.1 Obtención de complejos cúmulo oocitos (COCs)	15
3.2 Experimento 1	15
3.2.1 Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	15
3.3 Experimento 2	16
3.3.1 Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	17
3.3.2 Fertilización <i>in vitro</i> (Día 0)	17
3.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> (Día 1)	18
3.3.4 Cultivo <i>in vitro</i> (Día 3)	18
3.3.5 Cultivo <i>in vitro</i> (Día 7)	18
3.3.6 Vitrificación	18
3.4 Experimento 3	19
3.4.1 Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	19
3.4.2 Fertilización <i>in vitro</i> (Día 0)	20
3.4.3 Cultivo <i>in vitro</i> (Día 1)	20
3.4.4 Cultivo <i>in vitro</i> (Día 3)	21
3.4.5 Cultivo <i>in vitro</i> (Día 7)	21
3.4.6 Vitrificación	21
4. Análisis Estadístico	23
5. Resultados y discusión	25
5.1 Experimento 1	25
5.1.1 Para Sericina	26
5.1.2 Para Isoespiritanol	27

5.2	Experimento 2.....	27
5.3	Experimento 3.....	30
6.	Conclusiones	33
7.	Recomendaciones	35
8.	Bibliografía.....	37

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1. Concentraciones de Sericina adicionada al medio de maduración (%).....	16
Tabla 3-2. Concentraciones de Isoespintanol adicionada al medio de maduración (μM) con SFB	16
Tabla 3-3. Concentraciones de sericina e isoespintanol (SFB) adicionada al medio de maduración.....	17
Tabla 3-4. Combinación de sericina e isoespintanol adicionada en el medio de maduración.....	19
Tabla 5-1. Resultados de maduración in vitro con diferentes concentraciones de Sericina	26
Tabla 5-2. Resultados de maduración in vitro con diferentes concentraciones de isoespintanol.....	27
Tabla 5-3. Resultados de desarrollo hasta etapa de blastocisto.....	27
Tabla 5-4. Resultados de reexpansión posdesvitrificación.....	28
Tabla 5-5: Resultados de desarrollo hasta etapa de blastocisto.....	30
Tabla 5-6. Resultados reexpansión posdesvitrificación.....	30

Introducción

Con el constante crecimiento demográfico a nivel mundial, se presiona al sector agropecuario a trabajar cada vez más para lograr alcanzar mínimamente la canasta familiar y, a su vez sostener la seguridad alimentaria [1]. Para esto es importante continuar con investigaciones que conlleven a un mejor desarrollo de biotecnologías en la reproducción animal que permita una mayor producción de animales con características fenotípicas y genotípicas de interés. Uno de los sectores con un impacto considerable en la alimentación es la ganadería [2].

La producción *in vitro* (PIV) de embriones es una biotecnología reproductiva que tiene un gran potencial como herramienta en el mejoramiento genético porque permite un acortamiento del intervalo generacional y logra aumentar la propagación del material genético en los hatos [3]. El proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son: Maduración de ovocitos, Fecundación de ovocitos maduros, Cultivo de embriones [4]. Luego de la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar, alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas de comenzada la maduración. De estos, aproximadamente el 80% es fecundado y comienzan a dividirse, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, el 25-40% alcanza el estadio de blastocisto (B) o blastocisto expandido (Bex) luego del cultivo durante 6-7 días [4].

En los últimos años, el objetivo de esta herramienta ha permitido el uso masivo y comercial de la técnica. También, se han venido utilizando a los embriones bovinos como modelos para la investigación de procesos metabólicos, genéticos y del desarrollo de embriones de otras especies, incluso la especie humana [3]. El número de embriones bovinos producidos *in vitro* y transferidos alrededor del mundo, pasó de 797.190 en el 2019 a 878.181 en 2020, con un crecimiento del 10,2%, sin embargo para los producidos *in vivo* se presentó una disminución del 7.9%, siendo Sur América con la mayor producción a nivel mundial [5]. A

partir de esta técnica, se dio inicio el desarrollo de nuevas biotecnologías como la clonación, la micromanipulación de embriones, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), la utilización de las células madres embrionarias y la transgénesis [3]. Además se tiene que, aunque la producción de embriones *in vitro* ha aumentado notablemente en Norteamérica, la mayoría de los embriones han sido transferidos en Brasil y Asia (China, Japón y Corea) [5].

Según la International Embryo Transfer Society (IETS), el número de embriones producidos *in vitro* y transferidos a receptoras ha aumentado en los últimos años, representando actualmente el 43,21 % del total de embriones transferidos a nivel mundial. Pero, en Europa es diferente, donde este porcentaje representa únicamente un 7,79 % del total [6].

La adición de suero bovino fetal (SBF) a los medios para la producción *in vitro* de embriones puede proporcionar tasas más altas de blastocistos, sin embargo parece afectar la viabilidad de estos [7]. El SBF en el medio de cultivo es responsable de la acumulación excesiva de lípidos ya sea, debido al mayor suministro de lípidos por el medio o debido, a alteraciones en el metabolismo mitocondrial [91], cambios en la estructura mitocondrial [92], inducción de apoptosis [91] y modificaciones en la expresión génica [93]. Se ha demostrado que dicha acumulación puede afectar negativamente el desarrollo de los embriones PIV (producidos *in vitro*) y los resultados después de la criopreservación no son favorables, pues son menos resistentes a esta técnica de conservación en comparación con los producidos *in vivo* [8]. Por lo tanto, es conveniente proponer otras alternativas en los componentes de los medios de cultivo. Se puede evaluar la reducción o reemplazo total del suero fetal bovino para disminuir la cantidad de gotas de lípidos dentro del citoplasma embrionario. El suero puede contener sustancias que inhiben el desarrollo celular. Algunos de esos factores pueden ser artefactos de la preparación, por ejemplo toxinas de contaminación bacterianas previas a la filtración [9].

Con el fin de mitigar el efecto negativo que causa la acumulación de lípidos producido por el suero fetal bovino, se busca alternativas de reemplazar la fuente proteica. Una buena opción es la sericina. Esta proteína contiene propiedades físicas y biológicas, tales como: Actividad antibacterial y antimicrobiana, protección a radiación solar ultravioleta (UV), facilidad para absorción y liberación de humedad, inhibición de actividad de la tirosina y de cinasa, actividad celular, propiedades anticoagulantes y anticancerígenas, además,

promueve el crecimiento celular y sirve como cicatrizante [10]. En algunos trabajos se ha demostrado que la suplementación del medio de maduración *in vitro* (IVM) con sericina, puede mejorar la competencia meiótica de los ovocitos y el desarrollo embrionario temprano en ovejas Sanjabi durante la temporada reproductiva [11]. Además la adición de sericina en los medios de cultivo promovió la formación de blastocistos ovinos *in vitro* [12].

Por otro lado, dentro de esta manipulación de células, hay exposición de cambios repentinos de luz, temperatura, pH, concentración de oxígeno, composición de medios, entre otros, que generan especies reactivas de oxígeno afectando la respuesta de los mecanismos de defensa antioxidante [13]. Debido a esto, la calidad de los embriones producidos, se puede ver afectada. Las especies reactivas de oxígeno (ERO's) son moléculas generadas por la reducción parcial del oxígeno molecular; la mayoría (excepto el peróxido de hidrógeno), poseen uno o más electrones desapareados, a lo que se le denomina radical libre [14]. Los radicales libres presentan estrés oxidativo, siendo el responsable de consecuencias patológicas [15]. La exposición a altas concentraciones de oxígeno (20 % en aire), potencia el aumento de los niveles de ERO's, disminuyendo los porcentajes de desarrollo embrionario en murinos, porcinos, caprinos, bovinos y humanos, generando arresto en el desarrollo, daño en el ADN, apoptosis y peroxidación lipídica, afectando la competencia embrionaria [14]. Los ovocitos y los embriones son células aerobias, respondiendo generalmente, igual a la acción de ROS pues el uso del O₂ produce energía alrededor de la mitocondria en la fosforilización oxidativa, generando estrés oxidativo responsable de daños en el embrión como alteraciones mitocondriales, bloqueo celular, depleción del ATP, apoptosis, entre otros [16]. Para mitigar el efecto de las ERO'S, se ha evaluado el efecto de la suplementación en los medios con antioxidantes y se ha encontrado que la L-Carnitina ejerce un importante efecto antioxidante, proporcionando múltiples mecanismos de protección celular al ovocito y al embrión en desarrollo [17]. Por otro lado, la suplementación en los medios de cultivo *in vitro* con resveratrol de embriones Hartón del Valle, mejora la supervivencia, criotolerancia y el estado oxidativo de los embriones es producidos *in vitro* [18].

El isoespintanol es considerado como mejor captador de radicales y mejor reductor que el timol en diferentes medios, siendo catalogado como dos veces mejor antioxidante. Inhibe en alimentos la peroxidación lipídica y en modelos animales se ha observado su capacidad para disminuir la inflamación. [19]. Incluso ha sido usado en aplicaciones biotecnológicas

y se encontró que el isoespintanol reduce el estrés oxidativo y las alteraciones espermiáticas en el semen canino congelado [20].

Además la utilización de bajas temperaturas para conservar estructuras reproductivas manipuladas mediante estas biotecnologías se ha convertido en una herramienta indispensable que permitirá consolidar y aumentar el impacto de estas técnicas en la ganadería de cualquier país del mundo [21]. La criopreservación tiene como finalidad mantener las estructuras en un estado de animación suspendida, deteniendo los procesos biológicos, como actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento y multiplicación de la célula, logrando sobrevivir después de un período de tiempo [22].

Los embriones PIV son más sensibles al enfriamiento y la congelación, principalmente debido a la proporción de lípidos y proteínas, además de producir mayor cantidad de vacuolas, menos células totales y mayor fragilidad de la zona pelúcida [23]. La criopreservación de embriones por medio de métodos convencionales de congelamiento no ha alcanzado tasas de sobrevivencia satisfactorias, lo que ha llevado a la utilización de otros métodos como la vitrificación [24]. Estos presentan un daño morfológico y funcional durante la criopreservación. Por esto, los procedimientos de criopreservación buscan minimizar dichos daños. [25]. La vitrificación se caracteriza por la utilización de una elevada concentración de crioprotectores y el enfriamiento ultrarrápido que previene la formación de cristales de hielo dentro y fuera de la célula [26].

Por otra parte, se ha demostrado que la adición de suero fetal bovino en los medios de maduración, trae beneficios en cuanto a la tasa de producción de blastocistos [27], aunque también genera una dificultad y es la de favorecer la acumulación de lípidos en el citoplasma, relacionado con bajas tasas de producción de blastocistos [28]. La presencia de estas estructuras en los embriones producidos *in vitro* se ha asociado a su alta sensibilidad a los procesos de criopreservación en general [29]. Además, el estrés oxidativo puede causar efectos negativos sobre la viabilidad, la expresión génica, la síntesis de proteínas, el desarrollo y la señalización molecular de gametos y embriones, aspectos de gran importancia para la producción de embriones *in vitro* [30]. Los medios de cultivo tienen un efecto dramático en la competencia del desarrollo y la resistencia a la crioconservación de los embriones resultantes [31].

Por lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo se evaluó el efecto del isoespintanol como agente antioxidante y la sericina como fuente de proteína reemplazando completamente el SFB, ambos como suplementos en los medios de maduración para la producción *in vitro* de embriones bovinos, y a su vez, se evaluó la criotolerancia de los embriones producidos con ambos suplementos.

1. Objetivo General

Evaluar el efecto del isoespintanol y la sericina como suplementos en los medios para la producción *in vitro* de embriones bovinos.

1.1 Objetivos específicos

- Evaluar la suplementación del medio para la MIV de ovocitos bovinos con isoespintanol, sericina y sus combinaciones, y su efecto sobre la maduración *in vitro*.
- Evaluar la suplementación del medio para la MIV de ovocitos bovinos con isoespintanol, sericina y sus combinaciones, y su efecto sobre el desarrollo *in vitro*.
- Determinar la criotolerancia de embriones bovinos producidos *in vitro*, previamente suplementados durante la MIV con isoespintanol, sericina y sus combinaciones.

2. Marco Teórico

2.1 Importancia de la producción *in vitro* de embriones bovinos

Durante muchos años se ha trabajado buscando reproducir artificialmente los eventos de la maduración y fertilización ovocitaria, y el desarrollo embrionario temprano. Así, lo que en principio sólo tenía fines de investigación, en los últimos años se ha comenzado a utilizar con propósitos comerciales [4]. El desarrollo *in vitro* de los ovocitos está íntimamente relacionado con la aptitud que adquieren durante su etapa folicular previa [32]. El desarrollo folicular es un proceso continuo que finaliza con la ovulación y consta de dos fases; la primera, conocida como “desarrollo folicular basal” y la segunda fase se conocen como “desarrollo folicular terminal” y depende estrictamente de las gonadotropinas [33].

La producción de embriones *in vitro* es un procedimiento que consta de varias etapas, pueden resumirse en las siguientes: obtención de ovocitos, selección de los ovocitos, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y cultivo de los cigotos resultantes hasta blastocistos [34]. Entre las aplicaciones de la técnica se encuentra el mejoramiento genético con fines productivos, la investigación con fines de conservación y la generación de técnicas de reproducción asistida [35]. Uno de los principales factores que limitan la eficiencia de esta biotecnología, es la maduración *in vitro*, ya que aún después de la selección cuidadosa de una población homogénea de complejos cúmulo-ovocito, solo poco más de la tercera parte alcanzan la maduración citoplásmica completa y poseen la capacidad de producir blastocistos viables para su transferencia [36]. Es importante tener presente que un embrión producido *in vivo* es el resultado final de una serie de complejos eventos altamente relacionados, integrados y bajo el control de mecanismos perfeccionados por miles de años de evolución [37].

2.2 Crioconservación en la producción *in vitro* de embriones bovinos

A pesar de ser considerada una biotecnología ya establecida, la alta sensibilidad después de la criopreservación todavía representa uno de los mayores desafíos a superar para la amplia difusión de la transferencia de embriones producidos *in vitro* [38]. La crioconservación de embriones considera, no sólo los estudios en relación a las técnicas y crioprotectores a usar para obtener altas tasas de sobrevivencia embrionaria, si no también estudia los cambios celulares ocurridos durante estos procesos [39].

En los últimos años, el progreso en el campo de la biotecnología reproductiva ha sido significativo debido principalmente al mayor entendimiento alcanzado en cuanto a los requerimientos y al metabolismo de los gametos y de los embriones [37]. La criobiología constituye una rama de la biología cuyo objetivo principal es la conservación de células vivas mediante la utilización de bajas temperaturas, logrando detener los procesos de envejecimiento y degeneración celular [40]. Dentro de las diferentes técnicas de criopreservación desarrolladas destacan la congelación lenta, así como la vitrificación, permiten la conservación de este material por tiempo prolongado [41]. La necesidad de un entrenamiento riguroso, además de la habilidad técnica precisa, más el tiempo requerido para manipular cada embrión inmediatamente antes de la transferencia, son circunstancias peculiares que restringen el uso más amplio de este método de crioconservación [42].

La vitrificación es la solidificación de un líquido logrado por una elevación extrema en viscosidad durante el enfriamiento. Se han obtenido excelentes resultados en la conservación de embriones; sin embargo, sus porcentajes de sobrevivencia no son satisfactorios [43]. Esta técnica ha sufrido múltiples modificaciones, en el intento por simplificar sus procedimientos y mejorar las tasas de viabilidad; como el uso de diferentes crioprotectores, sistemas de empaque de los embriones u ovocitos y el uso de nitrógeno súpercongelado [38]. La vitrificación es el método de criopreservación más eficiente para embriones producidos *in vitro*, que son más sensibles a las lesiones criogénicas que sus contrapartes *in vivo* porque contienen más gotas de lípidos intracelulares [44].

Los embriones, al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales que lesionan las estructuras citoplasmáticas. Esta deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación [39].

2.3 Fuentes de proteína en la producción in vitro de embriones bovinos

En la composición de los medios de maduración se requiere una fuente de proteína, la cual generalmente es suero fetal bovino, siendo responsable de la acumulación excesiva de lípidos, ya sea debido al mayor suministro de lípidos proporcionado por el medio, o debido a alteraciones en el metabolismo mitocondrial [42]. Con el fin de mitigar el efecto negativo que causa la acumulación de lípidos producido por el suero fetal bovino, se buscan alternativas de reemplazar la fuente proteica.

En un trabajo experimental encontraron un incremento significativo en la tasa de producción de blastocistos, cuando los ovocitos eran madurados en presencia de PVP40 (frente a los madurados en BSA-V o PVA) [45].

Por otro lado, se ha encontrado que la inclusión de Fluido Folicular al medio de maduración in vitro de ovocitos podría jugar un rol clave en la maduración nuclear y citoplasmática para adquirir la capacidad fecundante y continuar el posterior desarrollo embrionario debido a que este contiene gonadotropinas y factores de crecimiento [46].

Una buena opción se trata de la sericina, que es un tipo de proteína hidrosoluble y de estructura globular compuesta principalmente por β -hoja y espiral al azar [47]. Esta proteína contiene propiedades físicas y biológicas, tales como: la actividad antibacterial y antimicrobiana, la protección a la radiación solar ultravioleta (UV), la facilidad para la absorción y liberación de humedad, la inhibición de la actividad de la tirosina y de la cinasa, la actividad celular, las propiedades anticoagulantes y anticancerígenas, además, promueve el crecimiento celular y sirve como cicatrizante [10].

La sericina puede prevenir el estrés oxidativo durante el cultivo de embriones bovinos y, por lo tanto, mejorar la calidad del embrión y aumentar el desarrollo embrionario [48]. También que, la adición de sericina, en lugar de suero fetal bovino (FBS), al medio de maduración amplió el espacio perivitelino, aumentó la producción de ácido hialurónico (HA) y disminuyó la fertilización poliespérmica en los ovocitos bovinos [49]. La suplementación con sericina al 0.1% puede mejorar las tasas de maduración y fertilización total de los ovocitos de oveja cultivados en un medio de maduración suplementado sin suero fetal bovino [48]. Además, la sericina es una glicoproteína que posee propiedades biológicas, como antioxidación, inmunomodulación e inhibición de actividades de tirosinasa y elastasa.

Además, reduce especies reactivas de oxígeno (ERO'S), protege las células normales del daño oxidativo de radiación UVB y H_2O_2 , inhibe la progresión del cáncer y es un agente antibacteriano [50].

En estudios previos, se encontró que el suplemento de sericina en medios maduros mejoró la calidad previa a la implantación y el desarrollo de embriones bovinos cultivados individualmente al prevenir el estrés oxidativo [51]. Por otra parte, se halló que la adición de sericina durante el cultivo de embriones mejoró la calidad de los embriones cultivados individualmente además de la viabilidad de los embriones congelados y descongelados después de la transferencia a los receptores [52].

2.4 Uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones bovinos

Las especies reactivas de oxígeno (ERO'S por sus siglas en inglés Reactive oxygen species) es un término que incluye radicales centrados o no en oxígeno, los cuales se producen constantemente como producto del metabolismo celular normal [53]. Las ERO'S incluyen radicales libres como radicales anión superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (OH.) y especies radicales no libres como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (O_2) [54]. La cadena respiratoria mitocondrial es susceptible a daño oxidativo; principalmente los complejos I y II por la producción de radicales superóxido y nitrilo, los cuales pueden afectar proteínas mitocondriales y alterar la función de muchas enzimas metabólicas en la cadena transportadora de electrones mitocondrial [13].

El estrés oxidativo es uno de los principales factores que afecta el desarrollo de los embriones *in vitro* ya que estas ERO'S ejercen efectos negativos sobre muchas biomoléculas, como ADN, proteínas y lípidos, por lo que pueden alterar o modular la función normal de la célula. El estrés oxidativo genera alteración de moléculas y rutas celulares lo que puede causar un bloqueo e incluso una regresión en el desarrollo celular [53] [55]. Para controlar estos efectos se han implementados antioxidantes exógenos para incrementar la capacidad antioxidante de los embriones por medio del aumento de captadores de E'ROS intracelulares como el glutatión reducido (GSH) [55]. Un compuesto con actividad antioxidante es aquel que actúa como un donador de electrones para las especies oxidantes y por lo tanto lleva a la inactivación de estas moléculas o a la producción de moléculas radicales lo suficientemente estables para no ser reactivas [56].

En embriones se ha encontrado diferentes efectos negativos debido al estrés oxidativo. El metabolismo de estos genera ERO'S, siendo la producción de estos radicales importante durante la manipulación *in vitro* [57]. Las ERO'S son capaces de difundirse a través de las membranas biológicas y alterar diferentes tipos de moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando funciones mitocondriales, bloqueo del desarrollo embrionario, disminución de la concentración de ATP e inducción a apoptosis [58]. Por lo anterior el uso de antioxidante en los medios de cultivo es considerable debido a que a bajas concentraciones, retrasa o inhibe la oxidación del sustrato oxidable presente [59]. Se ha demostrado que la adición de antioxidantes en los medios de maduración [60], fecundación [61, 62], de desarrollo [63], congelación seminal [64, 65] y de vitrificación [66] mejora las tasas de éxito de cada proceso.

En estudios anteriores se ha encontrado que la adición de vitaminas MEM (Medio Esencial Mínimo) como antioxidante en un medio de maduración de ovocitos semidefinido, afecta positivamente el desarrollo posterior y la viabilidad de los embriones caprinos [67]. En otros estudios, se halló que la suplementación al medio MIV con quercetina y cisteamina, aunque el porcentaje de maduración nuclear no difirió entre grupos, el porcentaje de blastocisto fue mayor con estos antioxidantes frente al grupo control [68]. También estudios adicionales reportan que la suplementación con Ácido α - linoleico (ALA) al medio MIV de ovocitos bovinos incrementa la tasa de maduración, la producción, desarrollo y calidad de los blastocitos [69].

El isoespintanol o 2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol, es un monoterpeno sólido, incoloro y cristalino de peso molecular 210 g/mol, es extraído de las hojas de *Oxandra xylopioides* con disolventes de baja polaridad [70]. En estudios realizados previamente, se encontró que el isoespintanol en diferentes concentraciones tiene un efecto antioxidante en el semen equino posdescongelado, produciendo una disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno [19]. El isoespintanol ha demostrado ser el mejor captador y reductor de radicales siendo descrito como dos veces el mejor antioxidante que incluso el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), debido a que poseen efectos tóxicos, se bioacumulan en el tejido graso y son posibles carcinógenos [71].

3. Metodología

3.1 Obtención de complejos cúmulo ovocitos (COCs)

Los complejos cúmulus-ovocito (COCs) se recuperaron de ovarios de hembras sacrificadas en la planta de beneficio local. Se transportaron a 37°C hasta el laboratorio de Biotecnología del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid Sede Bello. Se realizó la aspiración de los folículos ováricos con tamaño entre 2 y 8 mm. El líquido folicular se recolectó en tubos cónicos de 15 ml a 35°C, dejándose decantar por 20 minutos hasta obtener un precipitado el cual se depositó en una caja de petri estéril de 60 x 15 mm, para llevar a cabo la búsqueda y selección del COCs. Utilizando estereomicroscopio, se seleccionaron los COCs tipo I; aquellos que poseían un citoplasma homogéneo y una capa compacta y brillante de células del cúmulo, y tipo II; aquellos que poseían una capa menos compacta y más oscura de células del cúmulo [72].

Para llevar a cabo los objetivos planteados, la metodología se llevó a cabo en tres experimentos.

3.2 Experimento 1

Evaluar la suplementación del medio para la MIV de ovocitos bovinos con isoespintanol, sericina y su efecto sobre la maduración *in vitro*.

3.2.1 Maduración in vitro (MIV)

El medio de maduración se preparó con TCM 199 (con sales earle's y L-glutamina, Gibco 11150-059), Piruvato de sodio (11 mg/mL, Sigma P4562), FSH (129 mg/mL), Antibiótico (Amikacina 33 mg/mL), Cisteamina (1.13 mg/mL, Sigma 30078) y como fuente proteica se utilizó sericina en diferentes concentraciones (Tabla 3-1), como tratamiento control se usó 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF, Sigma N4887), en el caso del isoespintanol se usó en diferentes concentraciones con SFB (Tabla 3-2), en gotas de 100 µl con 10 - 20 COCs.

Las gotas se cubrieron con aceite mineral para evitar su evaporación. Las condiciones de cultivo fueron 38.5°C, 5% CO₂ en aire a 90% de humedad relativa por 24 horas. Se repitió para cada uno 3 veces [96].

Tabla 3-1. Concentraciones de sericina adicionada al medio de maduración (%)

Tratamiento	Suplementación con sericina durante la maduración <i>in vitro</i> de embriones
Control	Sin suplementación con Sericina
0.1%	Suplementación con 0.1% de Sericina
0.5%	Suplementación con 0.5% de Sericina
1.0%	Suplementación con 1.0% de Sericina
2.5%	Suplementación con 2.5% de Sericina

Tabla 3-2. Concentraciones de isoespintanol adicionada al medio de maduración (µM) con SFB

Tratamiento	Suplementación con Isoespintanol durante la maduración <i>in vitro</i> de embriones
Control	Sin suplementación con Isoespintanol
10 µM	Suplementación con 10 µM de Isoespintanol
20 µM	Suplementación con 20 µM de Isoespintanol
30 µM	Suplementación con 30 µM de Isoespintanol

Luego de 24 horas de maduración, se eliminaron las células del cúmulus con el fin de visualizar con facilidad la expulsión del primer corpúsculo polar, como indicador de la maduración del ovocito y así, conocer la tasa de maduración para cada tratamiento.

3.3 Experimento 2

Evaluar la suplementación del medio para la MIV de ovocitos bovinos con isoespintanol, sericina y sus combinaciones, y su efecto sobre el desarrollo *in vitro*.

Determinar la criotolerancia de embriones bovinos producidos *in vitro*, previamente suplementados durante la MIV con isoespintanol, sericina y sus combinaciones.

Se llevó a cabo 3 repeticiones.

3.3.1 Maduración *in vitro* (MIV)

Se seleccionaron las dos concentraciones con tendencia a la obtención de mejores resultados, tanto para sericina como para isoespintanol a partir del experimento 1, además se tuvo en cuenta un segundo control en el cual no hubo ninguna fuente de proteína. Los tratamientos se clasificaron de la siguiente manera:

Tabla 3-3. Concentraciones de sericina e isoespintanol (SFB) adicionada al medio de maduración

Tratamiento	Suplementación de sericina e isoespintanol durante la maduración <i>in vitro</i> de embriones
T1: Control 1	MIV con suero fetal bovino (SFB)
T2: Control 2	MIV sin ninguna fuente de proteína
0.5%	MIV sin SFB con sericina al 0.5%
1.0%	MIV sin SFB con sericina al 1%
10 μ M	MIV con SFB e isoespintanol 10 μ M
20 μ M	MIV con SFB e isoespintanol 20 μ M

Luego de las 24 horas en medio de maduración, se evaluó el porcentaje de maduración mediante la evaluación de la expansión del complejo cúmulo ovocito.

A partir de esta fase, se realizó el proceso completo hasta estadio de blastocistos de la siguiente manera:

3.3.2 Fertilización *in vitro* (Día 0)

Se utilizó el semen de un toro de la raza Holstein, el cual se descongeló a 38°C por un minuto y se seleccionaron los espermatozoides viables y móviles mediante gradiente de All-Grad® (LifeGlobal AG90-050), se centrifugó a 4500 revoluciones/min durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se llevó a cabo el conteo de espermatozoides en cámara de Neubaer con el fin de calcular la concentración de espermatozoides y hallar la dilución final; con este pellet también se evaluó la motilidad inicial y final.

Se hicieron gotas de 50 μ l de medio de fertilización suplementado con piruvato de sodio (2,2 mg/mL, Sigma P4562), heparina (10 μ g/mL, Fresenius Kabi LEM00515VS13), PHE (Penicilamina, Sigma P4875; Hipotaurina, Aldrich H1384; Epinefrina, Sigma E4250) y solución antibiótica (Amikacina 33 mg/mL). Se cubrieron con aceite mineral. En esta etapa, se dejó en incubadora durante 18-20 horas a 38.5°C, 5% CO₂ en aire a 90% de humedad relativa [97].

3.3.3 Cultivo in vitro (Día 1)

Pasadas las 18–20 horas de fertilización, se hizo una denudación con micropipeta dentro de la gota de FIV con el fin de retirar las células del cúmulus más sueltas. Los posibles cigotos se colocaron en un medio de equilibrio y con ayuda de pipeta de vidrio bucal, se retiraron las células del cúmulo completamente. Finalmente se hizo lavado en medio SOF compuesto por SFB (Sigma N4887) (5%), Glutamina (1.94 mg/mL, Sigma G8540), Piruvato de sodio (8 mg/mL, Sigma P4562), Aminoácidos esenciales (3%, Sigma B6766), Aminoácidos no esenciales (1%, Sigma M7145) y Amikacina (33 mg/mL) y se pusieron en gotas de cultivo de 50 µL cubiertas con aceite mineral.

Finalmente se colocaron dentro de un recipiente totalmente hermético con una placa de petri pequeña con agua ultrapura para garantizar la humedad del ambiente, se agregó mezcla de gases (90% N₂, 5% O₂ y 5% CO₂) y se pusieron en incubadora a 38.5°C hasta el día 3.

3.3.4 Cultivo in vitro (Día 3)

Usando el estereomicroscopio, se seleccionaron los cigotos con división celular. Se hizo recambio completo de medio para los cigotos clivados en gotas 50 µL de SOF. Se halló tasa de clivaje a partir del total de ovocitos iniciales. Nuevamente se colocaron dentro de un recipiente totalmente hermético con una placa de petri pequeña con agua ultrapura para garantizar la humedad del ambiente, se agregó mezcla de gases (90% N₂, 5% O₂ y 5% CO₂) y se pusieron en incubadora a 38.5°C hasta el día 7.

3.3.5 Cultivo in vitro (Día 7)

Se evaluó la producción de blastocisto teniendo en cuenta la clasificación de BI (Blastocisto inicial), BL (Blastocisto), BX (Blastocisto expandido) y BE (Blastocistos eclosionado), se estimó la tasa de producción de acuerdo al total de ovocitos iniciales. Finalmente se seleccionaron los blastocistos y se vitrificaron.

3.3.6 Vitrificación

Los embriones se transfirieron en una gota de 200 µl de solución de equilibrio la cual estuvo compuesta por 8.25% de EG, 8.25% de DMSO, 20% SBF en Medio TCM-Hepes (Sigma – Aldrich) a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego los embriones se transfirieron a

dos gotas de 200 µl de solución de vitrificación la cual estuvo compuesta por 16.5% de EG, 16.5% de DMSO, 0.5 M de trehalosa y 20% de SBF en medio TCM-Hepes (Gibco 12350-039), este paso se repitió dos veces. Por último, los embriones se cargaron en el soporte de vitrificación y se sumergieron en nitrógeno líquido. El proceso completo desde la exposición a la solución de vitrificación hasta el sumergimiento en nitrógeno líquido se realizó en 1 minuto. A las 24 horas de la criopreservación, las estructuras se desvitrificaron utilizando el siguiente protocolo:

Los embriones vitrificados se calentaron al sumergir los soportes de vitrificación directamente en la solución de calentamiento, la cual estuvo compuesta por 1.0 M de trehalosa y 20% SBF en TCM-Hepes a 37°C durante 1 minuto, para luego iniciar el proceso de remoción de los crioprotectores. Luego los embriones se transfirieron a una segunda solución de calentamiento compuesta por 0.5 M de trehalosa y 20% de SBF en medio TCM-Hepes y se dejaron allí durante tres minutos. Por último los embriones se transfirieron a una tercera solución de calentamiento en medio TCM-Hepes con 20% de SBF y se dejaron allí durante 5 minutos. Posteriormente los embriones se colocaron en gotas de cultivo sin antioxidante para evaluar los porcentajes de reexpansión y desarrollo. Protocolo modificado a partir de investigaciones anteriores (Kuwayama, Vajta, Ieda, et al. 2005; Kuwayama, Vajta, Kato, et al. 2005) [85].

El medio donde se colocaron para evaluar reexpansión fue el mismo usado durante el cultivo. Finalmente se evaluó reexpansión a las 24, 48 y 72 horas.

3.4 Experimento 3

Evaluar la suplementación del medio para la MIV de ovocitos bovinos con isoespintanol, sericina y sus combinaciones, y su efecto sobre el desarrollo *in vitro*.

Determinar la criotolerancia de embriones bovinos producidos *in vitro*, previamente suplementados durante la MIV con isoespintanol, sericina y sus combinaciones.

Este último experimento se repitió 3 veces.

3.4.1 Maduración *in vitro* (MIV)

Se seleccionaron las concentraciones de sericina e isoespintanol con base a los resultados del experimento 2, además se tuvo en cuenta un segundo control en el cual no hubo ninguna fuente de proteína. Los tratamientos se clasificaron de la siguiente manera:

Tabla 3-4. Combinación de sericina e isoespintanol adicionada en el medio de maduración

Tratamiento	Suplementación de sericina e isoespintanol durante la maduración <i>in vitro</i> de embriones
Control 1	MIV con suero fetal bovino (SFB)
Control 2	MIV sin ninguna fuente de proteína
1.0% - 20 μ M	MIV con sericina 1% e isoespintanol 20 μ M

Luego de las 24 horas en medio de maduración, se evaluó el porcentaje de maduración, mediante la evaluación de la expansión del complejo cúmulus-ovocito. A partir de esta fase, se realizó el proceso completo hasta estadio de blastocistos de la siguiente manera:

3.4.2 Fertilización *in vitro* (Día 0)

Se utilizó el semen de un toro de la raza Holstein, el cual se descongeló a 38°C por un minuto y se seleccionaron los espermatozoides viables y móviles mediante gradiente de All-Grad® (LifeGlobal AG90-050), se centrifugó a 4500 revoluciones/min durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se llevó a cabo el conteo de espermatozoides en cámara de Neubaer con el fin de calcular la concentración de espermatozoides y hallar la dilución final; con este pellet también se evaluó la motilidad inicial y final.

Se hicieron gotas de 50 μ l de medio de fertilización suplementado con piruvato de sodio (2,2 mg/mL, Sigma P4562), heparina (10 μ g/mL, Fresenius Kabi LEM00515VS13)), PHE (Penicilamina, Sigma P4875; Hipotaurina, Aldrich H1384; Epinefrina, Sigma E4250) y solución antibiótica (Amikacina 33 mg/mL). Se cubrieron con aceite mineral. En esta etapa, se dejó en incubadora durante 18-20 horas a 38.5°C, 5% CO₂ en aire a 90% de humedad relativa [96].

3.4.3 Cultivo *in vitro* (Día 1)

Pasadas las 18–20 horas de fertilización, se hizo una denudación con micropipeta dentro de la gota de FIV con el fin el fin retirar las células del cúmulus más sueltas. Los posibles cigotos se colocaron en un medio de equilibrio y con ayuda de pipeta de vidrio bucal, se retiraron las células del cúmulo completamente. Finalmente se hizo lavado en medio SOF compuesto por SFB (Sigma N4887) (5%), Glutamina (1.94 mg/mL, Sigma G8540), Piruvato de sodio (8 mg/mL, Sigma P4562), Aminoácidos esenciales (3%, Sigma B6766), Aminoácidos no esenciales (1%, Sigma M7145) y Amikacina (33 mg/mL) y se pusieron en gotas de cultivo de 50 μ L cubiertas con aceite mineral.

Finalmente se colocaron dentro de un recipiente totalmente hermético con una placa de petri pequeña con agua ultrapura para garantizar la humedad del ambiente, se agregó mezcla de gases (90% N₂, 5% O₂ y 5% CO₂) y se pusieron en incubadora a 38.5°C hasta el día 3.

3.4.4 Cultivo in vitro (Día 3)

Usando el estereomicroscopio, se seleccionaron los cigotos con división celular, es decir los clivados de los no divididos. Se hizo recambio completo de medio para los cigotos clivados en gotas 50 µL de SOF. Se halló tasa de clivaje a partir del total de ovocitos iniciales. Nuevamente se colocaron dentro de un recipiente totalmente hermético con una placa de petri pequeña con agua ultrapura para garantizar la humedad del ambiente, se agregó mezcla de gases (90% N₂, 5% O₂ y 5% CO₂) y se pusieron en incubadora a 38.5°C hasta el día 7.

3.4.5 Cultivo in vitro (Día 7)

Se evaluó la producción de blastocisto teniendo en cuenta la clasificación de BI (Blastocisto inicial), BL (Blastocisto), BX (Blastocisto expandido) y BE (Blastocistos eclosionado), se estimó la tasa de producción de acuerdo al total de ovocitos iniciales. Finalmente se seleccionaron los blastocistos de mejor calidad y se vitrificaron.

3.4.6 Vitrificación

Los embriones se transfirieron en una gota de 200 µl de solución de equilibrio la cual contiene 8.25% de EG, 8.25% de DMSO, 20% SBF en Medio TCM-Hepes (Sigma – Aldrich) a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego los embriones se transfirieron a dos gotas de 200 µl de solución de vitrificación la estuvo compuesta por 16.5% de EG, 16.5% de DMSO, 0.5 M de trehalosa y 20% de SBF en medio TCM-Hepes, este paso se repitió dos veces. Por último, los embriones se cargaron en el soporte de vitrificación y se sumergieron en nitrógeno líquido. El proceso completo desde la exposición a la solución de vitrificación hasta el sumergimiento en nitrógeno líquido se realizó en 1 minuto. A las 24 horas de la criopreservación las estructuras, se desvitrificaron utilizando el siguiente protocolo:

Los embriones vitrificados se calentaron al sumergir los soportes de vitrificación directamente en la solución de calentamiento la cual estuvo compuesta por 1.0 M de trehalosa y 20% SBF en TCM-Hepes a 37°C durante 1 minuto para iniciar el proceso de remoción de los crioprotectores. Luego los embriones se transfirieron a una segunda solución de calentamiento compuesta por 0.5 M de trehalosa y 20% de SBF en medio TCM-Hepes y se dejaron allí durante tres minutos. Por último los embriones se transfirieron a una tercera solución de calentamiento en medio TCM-Hepes con 20% de SBF y se dejaron allí durante 5 minutos. Posteriormente los embriones se colocaron en gotas de cultivo sin antioxidante para evaluar los porcentajes de reexpansión y desarrollo. Protocolo modificado a partir de investigaciones anteriores (Kuwayama, Vajta, Ieda, et al. 2005; Kuwayama, Vajta, Kato, et al. 2005) [85].

El medio donde se colocaron para evaluar reexpansión fue el mismo usado durante el cultivo. Finalmente se evaluó reexpansión a las 24, 48 y 72 horas.

4. Análisis Estadístico

Se hizo una comparación de dos proporciones binomiales, debido a que las variables respuestas resultan ser dicotómicas a partir del n total de oocitos por tratamiento. Es decir, se tiene en cuenta el número de oocitos que maduraron, fecundaron y clivaron, llegaron a blastocistos en día 7 y finalmente, los que lograron reexpandir pos desvitrificación a las 24, 48 y 72 horas sobre el número total de oocitos usados. Usando el Método del Score Híbrido de Newcombe para cada experimento y tratamiento con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$)

El método de Newcombe está diseñado para construir un intervalo de confianza para la diferencia de dos proporciones binomiales; no, para contrastar un juego de hipótesis. No obstante, la evaluación del intervalo construido, en búsqueda de la diferencia nula, permite realizar afirmaciones equivalentes a las de un juego de hipótesis, rechazando la hipótesis de igualdad, con un nivel de significancia α , si el intervalo $(1 - \alpha)$ 100% contiene el cero, y no haciéndolo, en caso contrario. Puesto que este método no genera un estadístico de prueba, no es posible calcular un valor p con base en la definición clásica (Probabilidad de obtener un estadístico de prueba igual o más extremo que el observado, bajo la hipótesis nula). Sin embargo, si es posible obtener un pseudo valor p, mediante la construcción del intervalo de menor confianza posible que incluya el cero [73].

5. Resultados y discusión

Es relevante mencionar la importancia en la composición de los medios utilizados en la maduración *in vitro* de embriones, debido a que debe brindar condiciones adecuadas que sean similares a los nutrientes y ambiente del proceso que ocurre en la hembra de manera *in vivo* [74], además está demostrado que las bajas tasas de desarrollo embrionario están relacionadas con este factor [75], por esto es considerable seguir investigando y avanzando en la mejora de estos medios, sea buscando reemplazar o adicionando un suplemento que permita mejorar el desarrollo embrionario.

5.1 Experimento 1

Se ha buscado el reemplazo completo del SFB como fuente de proteína en los medios de maduración, al ser un derivado animal considerado como un suplemento parcialmente definido o indefinido en composición, siendo una fuente de variación en el desarrollo ovocitario hasta etapa de blastocisto [27]. Por otro lado, la presencia de SFB en los medios genera acumulación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas provocando alta sensibilidad en los embriones bovinos producidos *in vitro* en las técnicas de criopreservación en general [76].

Se conoce que las ERO's en exceso generan en las células, estrés oxidativo ocasionando daños en las moléculas, baja viabilidad y finalmente apoptosis [75]. Por esto la suplementación de agentes antioxidantes a los medios usados en la producción *in vitro* de embriones bovinos, ha demostrado incremento en las tasas de blastocistos [77]. De acuerdo a lo anterior, se considera importante hacer ensayos de suplementación de antioxidantes, en este caso de Isoespintanol, en los medios usados en esta técnica. Además, aún no se han encontrado revisiones ni investigaciones previas usando isoespintanol como antioxidante en medios de maduración en la producción *in vitro* de embriones bovinos.

Este ensayo se realizó con el fin de definir cuál concentración de sericina e isoespintanol agregados en los medios de maduración, tenía un mejor comportamiento en la tasa de maduración *in vitro*. Los resultados fueron los siguientes:

5.1.1 Para Sericina

Tabla 5-1. Resultados de maduración *in vitro* con diferentes concentraciones de Sericina

Tratamiento	n total	Maduros	%
Control	198	154	78 ± 5.7 ^a
0.10%	171	110	64 ± 3.4 ^b
0.50%	179	119	66 ± 3.4 ^{bc}
1%	189	105	56 ± 9.9 ^{bd}
2.50%	215	98	46 ± 14 ^e

Se seleccionaron estas concentraciones de Sericina porque en estudios previos en porcinos [78] y en ovejas de raza Sanjabi [11] se utilizaron, teniendo en cuenta concentraciones bajas, intermedias y altas, demostrando la reanudación meiótica de los ovocitos.

Para el tratamiento de control se halló una diferencia significativa con respecto a los tratamientos con sericina, mostrando un mayor porcentaje de maduración oocitaria. No se halló diferencia entre Sericina al 0,1%, 0,5% y 1%. Sin embargo, para la concentración de 2,5% si presentó diferencia respecto a los demás tratamientos, arrojando porcentajes de maduración bajos. Por lo tanto, esta última concentración se descartó para los dos ensayos siguientes. A pesar de lo anterior, el uso de sericina con las demás concentraciones produjo tasas de MIV cercanas a la alcanzada con el control con SFB, mostrando que esta molécula tiene un gran potencial para un reemplazo sino total, al menos parcial de dicho componente. La acción de la sericina como suplemento proteico para la MIV podría explicarse debido a que es el segundo componente proteico principal (además de la fibroína) de la seda y se extrae del capullo mediante un proceso de desgomado [86]. La sericina consta de 18 tipos de aminoácidos, la mayoría de los cuales tienen grupos laterales polares fuertes, como grupos hidroxilo, carboxilo y amino [87]. Además, tiene propiedades como la promoción de la viabilidad celular, la producción de colágeno, la aceleración de la proliferación celular, la supresión de la tumorigénesis de la piel y la carcinogénesis de colon [88].

5.1.2 Para Isoespintanol

Tabla 5-2. Resultados de maduración *in vitro* con diferentes concentraciones de isoespintanol

Tratamiento	n total	Maduros	%
Control	139	113	81 ± 1.9 ^a
10 µM	161	133	83 ± 7.7 ^a
20 µM	153	117	76 ± 1.8 ^a
30 µM	167	126	75 ± 2.3 ^a

Se tuvo en cuenta resultados encontrados en estudios previos para definir las concentraciones utilizadas en este experimento. Se ha reportado el uso de concentraciones entre 20 y 60 µM de isoespintanol en el semen equino diluido con fines de congelación [79] y en la congelación de espermatozoides caninos [20]. Además dado que se desconoce el efecto de concentraciones bajas de isoespintanol, se incluyó el uso de 10 µM. No se hallaron reportes previos de uso de esta molécula en la PIV de embriones. Estadísticamente, no se encontró diferencia entre las concentraciones evaluadas, sin embargo, se observó un aumento en media del porcentaje de maduración oocitaria para 10 µM en relación al control. Es posible que la presencia de cisteamina en el medio MIV enmascare el efecto antioxidante del isoespintanol. Se ha podido determinar que la adición de cisteamina al medio de maduración de ovocitos bovinos incrementa los niveles de glutatión intracelular, el cual tiene entre sus funciones la protección de las células contra el daño oxidativo [89]. La combinación de antioxidantes, puede generar sustancias químicas llamadas prooxidantes que inducen estrés oxidativo, normalmente mediante la formación de especies reactivas o por inhibición de los sistemas antioxidantes [90].

5.2 Experimento 2

A continuación, se presentan los resultados correspondientes al desarrollo *in vitro* de embriones bovinos producidos con sericina e isoespintanol.

Tabla 5-3. Resultados de desarrollo hasta etapa de blastocisto

Tratamientos	n	Maduración	Clivaje D3	Muertos	% Blastocisto D7
Control 1	193	96% ±4.2 ^a	71% ±4.2 ^a	8% ±3.7 ^{ab}	34% ±7.1 ^{ac}

Control 2	172	82% ±11.3 ^b	62% ±5.5 ^{ab}	8% ±3.6 ^b	21% ±7.8 ^b
0.5%	184	88% ±3.7 ^b	59% ±9.2 ^b	13% ±5.8 ^a	26% ±5.0 ^{ab}
1.0%	161	80% ±7.9 ^b	63% ±5.3 ^{ab}	12% ±6.2 ^{ab}	26% ±6.3 ^{ab}
10µM	173	97% ±2.1 ^a	65% ±4.5 ^{ab}	14% ±4.6 ^a	31% ±5.9 ^{abc}
20µM	178	96% ±2.2 ^a	74% ±4.7 ^a	12% ±4.8 ^{ab}	38% ±7.0 ^c

Control 1: MIV suplementado con SFB, Control 2: MIV sin suplementación proteica, 0.5%: MIV suplementado con 0,5 % de sericina, 1.0%: MIV suplementado con 1% de sericina, 10µM: MIV suplementado con 10 µM de isoespintanol, 20µM: MIV suplementado con 20 µM de isoespintanol.

La concentración de 0.5% de sericina de este experimento se seleccionó basándose en estudios previos en ovejas de raza Sanjabi donde se encontró que hubo un efecto significativo sobre la maduración nuclear y el desarrollo embrionario temprano [11]. Además, en otro experimento, la sericina mejoró la calidad de los espermatozoides del epidídimo de ratón congelados y descongelados y resultó en un mayor desarrollo embrionario [80]. En embriones producidos *in vivo* congelados, la sericina mejoró los porcentajes de receptoras con gestación y parto normal cuando el medio fue suplementado con 0,5% de sericina y 20% de SFB con respecto al medio de congelación con 0.4% BSA y 20% SFB (47,3% vs 40,1% y 94,6% vs 87,3%, respectivamente) [52]. Y la concentración de 1% estuvo basada en el hallazgo de Do L et al. donde se encontró que, durante el cultivo de maduración en porcinos, mejoró la maduración nuclear de ovocitos y la calidad de los embriones en porcinos usando esta concentración de sericina [78]. Por otro lado, en un estudio en medios de congelación, donde se evaluó el reemplazo de SFB con 1 % (v/w) de sericina, 0,5 % (v/w) de maltosa, 0,3 % (v/p) prolina, 0,3 % (v/p) de glutamina y 10 % de DMSO, el medio construido con sericina crioconservó con éxito la línea celular de mieloma P3U1 y células de ovario de hámster chino tan eficientemente como el medio convencional de SFB que contenía 10 % de DMSO y fue superior a otros tres medios adquiridos comercialmente [81]. A continuación, se presentan los resultados de reexpansión de los embriones vitrificados / desvitrificados.

Tabla 5-4. Resultados de reexpansión posdesvitrificación

Tratamientos	n	Reexpansión 24 h	Reexpansión 48 h	Reexpansión 72 h
Control 1	193	20% ±6.7 ^a	17% ±5.9 ^{ac}	3% ±2.8 ^a
Control 2	172	17% ±13.1 ^a	10% ±5.6 ^a	3% ±2.8 ^{ab}
0.5%	184	23% ±8.3 ^a	27% ±7.2 ^{ac}	14% ±14 ^{ab}

1.0%	161	30% ±14.3 ^{ab}	21% ±9.3 ^{abc}	13% ±7.3 ^{bc}
10 µM	173	21% ±12.5 ^a	29% ±10.5 ^{bc}	11% ±6.6 ^{ab}
20 µM	178	45% ±7.6 ^b	37% ±7.2 ^b	31% ±2.1 ^c

Control 1: MIV suplementado con SFB, Control 2: MIV sin suplementación proteica, 0.5%: MIV suplementado con 0,5 % de sericina, 1.0%: MIV suplementado con 1% de sericina, 10µM: MIV suplementado con 10 µM de isoespintanol, 20µM: MIV suplementado con 20 µM de isoespintanol.

Respecto al Isoespintanol, se seleccionaron las concentraciones de 10 µM y 20 µM, debido a la revisión literaria, donde se ha encontrado que la suplementación con 20 µM al medio de congelación de semen equino puede mejorar el potencial de membrana mitocondrial del semen congelado-descongelado [82]. En otro trabajo similar, se encontró que con suplementación de 20 µM de isoespintanol en medio de congelación hubo un aumento de la población de espermatozoides con actividad mitocondrial alta en semen equino [83], y el uso de 10 µM de isoespintanol produjo una media superior respecto a los demás tratamientos incluido el control.

Para este segundo ensayo, la evaluación de la maduración se hizo considerando la expansión de las células del cúmulo, dado que se ha encontrado que la expansión de las células del cúmulo y la maduración nuclear (MII) son factores críticos para determinar el potencial de desarrollo de los ovocitos después de la fertilización [11]. Para esta variable no se encontró diferencia significativa entre el control 1, 10 µM y 20 µM, lo mismo ocurrió entre el control 2, 0.5% y 1.0%. En cambio, sí hubo diferencia significativa entre estos tres tratamientos con respecto al control 1, 10 µM y 20 µM (Tabla 5-3).

Para la variable de clivaje no se presentó diferencia significativa entre control 1, control 2, 1.0%, 10 µM y 20 µM. Sin embargo el 0.5% no presentó diferencia significativa con respecto a control 2, 1.0% y 10 µM, pero 0.5% si presentó diferencia significativa con los tratamientos control 1 y 20 µM mostrando porcentajes más bajos para 0.5%.

En la producción de blastocistos al día 7, no hubo diferencia significativa entre control 1, 0.5%, 1.0% y 10 µM. El control 1 mostró diferencia significativa con control 2, siendo este último más bajo. Además, control 2 también presentó diferencia significativa con respecto a 20 µM, donde la suplementación con isoespintanol arrojó mejor tasa de blastocistos.

A partir de lo anterior, se infiere que la sericina a pesar de generar una tasa de maduración inferior al control suplementado con SFB y a pesar de no ser diferente a la MIV del control sin suplementación proteica, produjo tasas de clivaje y desarrollo equivalentes a las alcanzadas mediante la suplementación con SFB. Por su parte, el uso de isoespintanol no

generó cambios en los resultados de las diferentes etapas del desarrollo *in vitro* en relación con el control con SFB, más allá de haber presentado el máximo valor (no estadísticamente diferente) en la tasa de blastocistos *in vitro*.

Para la reexpansión a las 24 horas no se encontró diferencia significativa entre el control 1, control 2, 0.5%, 1.0% y 10 μ M, sin embargo, si hubo diferencia significativa entre control 1, control 2, 0.5% y 10 μ M con respecto a 20 μ M. Entre 1.0% y 20 μ M no hubo diferencia significativa.

Para la reexpansión a las 48 horas no hubo diferencia significativa entre control 1, control 2, 0.5% y 1.0%. En los tratamientos 1.0%, 10 μ M y 20 μ M no hubo diferencia significativa. En el caso de control 1 y 10 μ M no se presentó diferencia significativa, pero si se hubo diferencia significativa para el 20 μ M con respecto al control 1, control 2 y 0.5%.

En la variable reexpansión a las 72 horas no hubo diferencia significativa entre control 1, control 2, 0.5% y 10 μ M. Para 20 μ M se evidenció diferencia significativa con control 1, control 2, 0.5%, 10 μ M. Entre control 1 y 1.0% tampoco hubo diferencia significativa.

En las últimas tres variables, cabe resaltar que la sobrevivencia y reexpansión de las estructuras del blastocisto disminuye a medida que pasa el tiempo, podría decirse que la reexpansión más óptima en este estudio es a las 24 horas. En este tiempo se evidencia mejores resultados con suplementación de 20 μ M de isoespintanol y en el caso de sericina hubo mejor reexpansión con 1%, lo que podría indicar menor sensibilidad a la vitrificación.

5.3 Experimento 3

En este caso, se usó la combinación de Sericina e Isoespintanol usando las concentraciones previamente seleccionadas, con el fin de evaluar el desarrollo y criotolerancia en embriones bovinos producidos *in vitro*.

Tratamientos	n total	Maduración subjetiva	Clivaje	Muertos	Blastocistos D7
Control 1	140	118 \pm 17.5 ^a	115 \pm 7.6 ^a	12 \pm 3.2 ^a	58 \pm 6.2 ^a
Control 2	143	110 \pm 20 ^{ab}	107 \pm 4 ^a	16 \pm 2.8 ^a	37 \pm 3 ^b
1.0%-20 μM	213	160 \pm 8.7 ^b	149 \pm 5.7 ^b	9 \pm 2 ^a	41 \pm 5.6 ^b

Tabla 5-5: Resultados de desarrollo hasta etapa de blastocisto

Tratamientos	n	Reexpansión 24	Reexpansión 48	Reexpansión 72
Control 1	197	9 \pm 14.1 ^a	4 \pm 5.9 ^a	3 \pm 3.8 ^a
Control 2	202	4 \pm 7.2 ^a	2 \pm 2.7 ^a	1 \pm 2.7 ^a
1.0%-20 μM	214	8 \pm 8.7 ^a	5 \pm 7.4 ^a	3 \pm 6.3 ^a

Tabla 5-6. Resultados reexpansión posdesvitrificación

Control 1: MIV suplementado con SFB, control 2: MIV sin suplementación proteica, 1.0%-20 μ M: MIV suplementado con 1% de Sericina y 20 μ M de Isoespintanol.

Para este último ensayo, se quiso evaluar si la combinación de sericina con isoespintanol genera una mejoría en el desarrollo embrionario, desde la etapa de maduración hasta blastocisto. Para esto se seleccionó, basados en los resultados del ensayo anterior, el tratamiento para Sericina de 1%, aunque no hubo diferencia significativa entre ambas concentraciones en todas las variables de interés, presenta una tendencia en su media a mejorar el clivaje, menor número de cigotos muertos y su producción de blastocistos no se vio afectada entre ambas concentraciones. Para Isoespintanol se seleccionó 20 μ M debido a que presentó un porcentaje mayor para clivaje y producción de blastocistos en el día 7, a pesar de no ser diferente estadísticamente. No obstante se ha reportado que la implementación de antioxidantes a los medios, en este caso de maduración, usados para la producción *in vitro* de embriones bovinos, disminuye las ERO's en gametos y embriones, con el fin de mejorar su calidad y potencial reproductivo [13].

Al evaluar los resultados, se evidencia que en la maduración presentó una diferencia significativa entre control 1 y 1.0%-20 μ M, teniendo este último menos ovocitos maduros. Con respecto a control 2, no tuvo diferencia significativa con control 1 ni con 1.0%-20 μ M. Para la variable clivaje entre control 1 y control 2 no hubo diferencia significativa, sin embargo estos dos tratamiento mostraron diferencia significativa con 1.0%-20 μ M, este último con menor células divididas.

En la producción de blastocistos al día 7, arrojó diferencia significativa el control 1 con control 2 y 1.0%-20 μ M, donde control 1 produjo mayor número de blastocistos. Entre control 2 y 1.0%-20 μ M no hubo diferencia significativa.

Para las variables de reexpansión a las 24, 48 y 72 horas, no hubo diferencia significativa en ninguno de los tratamientos. Otros estudios han encontrado que la sericina se ha comportado como buen crioprotector, cuando se ha adicionado 1% al medio de congelación de las células madre de tejido adiposo, con una viabilidad superior al 95% [84].

Los resultados de este trabajo se podrían comparar con estudios previos en donde usaron SFB en los medios para el desarrollo embrionario bovino, en los cuales se obtuvo una tasa de maduración del 91%, clivaje de 84% y blastocisto de 54% [94]. En otro estudio realizado

en 2021, usando 10% de SFB en medio de maduración, se encontró para las tasas de clivaje en el día 3 del 87% y con producción de blastocisto al día 7 del 44% [95].

Basados en lo mencionado, se infiere que la combinación de Sericina con Isoespintanol, no mejora las tasas de desarrollo embrionario. Por lo cual sería posible pensar que la actividad antioxidante de la Sericina puede influir en el mecanismo antioxidante del isoespintanol enmascarándolo o viceversa. Se deja la pregunta de investigación para futuros trabajos experimentales ¿por qué la sericina y el isoespintanol usados de forma independiente funcionan mejor que cuando se combinan para el desarrollo embrionario *in vitro* en bovinos?

6. Conclusiones

- La sericina resulta ser una alternativa para un reemplazo parcial de las fuentes de proteína en medios de maduración para la producción *in vitro* de embriones bovinos.
- El uso de isoespintanol como protector antioxidante, puede mejorar las tasas de reexpansión en la desvitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*.
- La combinación de sericina con isoespintanol no favorece la maduración y el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*.

7.Recomendaciones

- Sería interesante evaluar en futuras investigaciones la causa del porqué no resulta tasas superiores de maduración y desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*, cuando se combina sericina e isoespintanol en los medios de MIV.
- Debido a que la sericina cuenta con diferentes propiedades y funciones como antimicrobiana, antioxidante, fuente de proteína, entre otras, hacer ensayos suplementando los medios MIV y de cultivo solo con esta molécula para analizar si en combinación, se suprime su efecto en la PIVE bovinos.
- Se sugiere hacer experimentos suplementando los medios MIV con otras concentraciones de isoespintanol, principalmente superiores, con el fin de ampliar el conocimiento del comportamiento de esta sustancia en la PIVE bovinos.

8. Bibliografía

[1] Fahsbender, J., & Kim, N. (2018). Livestock Transfers, Food Security and Women's Empowerment: Evidence from a Randomized Phased-in Program in Nicaragua. IDB. <https://doi.org/10.18235/0001447>.

[2] Muñoz, G. (2018, 2 agosto). La ganadería vacuna y la seguridad alimentaria. Banco Interamericano de Desarrollo. <https://blogs.iadb.org/sostenibilidad/es/la-ganaderia-vacuna-y-la-seguridad-alimentaria/>

[3] Gonella Diaza, Ángela M., Atuesta Bustos, J. E., Bernal Ulloa, S. M., & Chacón Jaramillo, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. Revista De Investigación Agraria Y Ambiental, 4(1), 65–80. <https://doi.org/10.22490/21456453.1967>

[4] Mucci, N, Aller, J F, Kaiser, G G, Hozbor, F, & Alberio, R H. (2006). In vitro production of bovine embryos: serum supplementation to the culture media. Archivos de medicina veterinaria, 38(2), 97-104. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200002>

[5] IETS Data Retrieval Committee. (2021). 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals (N°4). <https://www.iets.org/>

[6] Quintela Arias, L. A., Becerra, J. J., & Peña, A. (2016). Aplicaciones de los embriones bovinos producidos in vitro. https://www.researchgate.net/publication/308968839_Aplicaciones_de_los_embryones_bovinos_producidos_in_vitro

[7] Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi MI, et al. Fetal calf serum enhances in vitro production of Bos taurus indicus embryos. Theriogenology. 2011; 75:429–433. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.08.017 PMID: 20961608 10.

- [8] Solís, A., Sandoya, G., & de Armas, R. (2012). Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. *Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro*, 13(10). <https://www.redalyc.org/pdf/636/63624631005.pdf>
- [9] Simancas-Escorcia, V, Vergara Hernández, C, & Díaz-Caballero, A. (2018). Influencia del suero fetal bovino en el cultivo de fibroblastos gingivales. *Avances en Odontoestomatología*, 34(6), 299-309. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852018000600004&lng=es&tlng=es
- [10] Barajas-Gamboa, J. A., Serpa-Guerra, A. M., Restrepo-Osorio, A., & Álvarez-López, C. (2016). Aplicaciones de la sericina: una proteína globular proveniente de la seda. *Ingeniería y Competitividad*, 18(2), 193. <https://doi.org/10.25100/iyc.v18i2.2167>
- [11] Aghaz, F., Hajarian, H., Shabankareh, H. K., & Abdolmohammadi, A. (2015). Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season. *Theriogenology*, 84(9), 1631–1635. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.08.013>
- [12] Aghaz, F., Hajarian, H., & Karami Shabankareh, H. (2016). Enhanced in vitro developmental competence of sheep embryos following sericin supplementation of the in vitro maturation and in vitro culture media. *Small Ruminant Research*, 136, 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.019>
- [13] Torres-Osorio, V., Urrego, R., Echeverri Zuluaga, J. J., & López-Herrera, A. (2019). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(2), 433–459. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>
- [14] Mora Agüero, S. D. L. N., Zeledón Aguilera, A. S., & Vargas Rubio, T. (2019). Estrés oxidativo y antioxidantes: efectos en el embarazo. *Revista Medica Sinergia*, 4(5), 89–100. <https://doi.org/10.31434/rms.v4i5.211>

- [15] Alfa Editores. (2018, 22 mayo). Ergotioneína y glutatión, antioxidantes benéficos de los champiñones. <https://www.alfa-editores.com.mx/ergotioneina-y-glutation-antioxidantes-beneficos-de-los-champinones/>
- [16] Delgado Tiburcio, G. A. (2018). Efecto de tres niveles de oxígeno en la atmósfera de cultivo y la adición de un antioxidante comercial en el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro. *Acta Universitaria*, 28(2), 53–57. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1769>
- [17] Jaramillo Bolívar, N., Arzuaga Cedeño, J. M., Giraldo Giraldo, J. J., & Vásquez Araque, N. A. (2019). Parámetros metabólicos, antioxidantes y competencia para el desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados in vitro con L-Carnitina. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 265–275. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15703>
- [18] Escobar Escobar, J. (2021). Evaluación del efecto antioxidante del Resveratrol sobre la criotolerancia de embriones bovinos de la raza Hartón del Valle producidos in vitro. Universidad Nacional de Colombia.
- [19] Restrepo B., G., & Rojano, B. A. (2018). Actividad antioxidante del isoespintanol y el timol en el semen equino criopreservado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 205–216. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14253>
- [20] Tejera M, I., Usuga S, A., Restrepo R, O., Restrepo B, G, & Gomez O, J. (2021). Congelación de semen canino en presencia de isoespintanol y ergotioneína: efecto sobre la calidad espermática posdescongelación. RediCES. <http://file:///D:/Descarga/348291-Article%20Text-239458-1-10-20211206.pdf>
- [21] Córdova Izquierdo, A., Guerra Liera, J. E., Villa Mancera, A., Olivares Pérez, J., Cansino Arroyo, G., Juárez Mosaqueda, M. D. L., & Pérez Gutiérrez, J. F. (2015). Congelación de embriones bovinos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9(2). https://doi.org/10.5209/rev_rccv.2015.v9.n2.51041
- [22] Rall, W. F. (1992). Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Animal Reproduction Science*, 28(1–4), 237–245. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90110-y](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90110-y)

- [23] Rodríguez, P., & Jiménez, C. (s/f). CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO. Org.co. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v58n2/v58n2a05.pdf>
- [24] García, J. L., Restrepo, S. J., Gómez, N., Moreno, E. R., Dubeibe, D. F. & Mogollón, E. M. (2017). Manual de procedimientos para la producción y vitrificación de embriones bovinos en laboratorio de reproducción animal. Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA, Universidad Cooperativa de Colombia.
- [25] Vajta, G., & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026>
- [26] de Munck, N., & Vajta, G. (2017). Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology*, 78, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.07.009>
- [27] Santa Cruz P., C., Huanca L., W., Condori P., R., & Ampuero B., A. (2014). Uso de Macromoléculas sobre la Tasa de Maduración y Desarrollo Embrionario in vitro de Ovocitos Bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4). <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10799>
- [28] Restrepo Betancur, G., Chavarria Gutierrez, N., & Vasquez Araque, N. (2007). Effect of bovine calf serum supplementation for the in vitro maturation of bovine oocytes on their mitochondrial activity and embryo d. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 14–22. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428098002>
- [29] Métodos, "., Congelaci, D. E., De, C., De Embriones, B., En, N., Líquido, "., José, E., Melendres, M., Fernando, G., Samaniego, V., Rafael, I. M. C., Oleas, V., Georgina, D., Moreno, I., Guillermo, I. M. C., Villa, F., Vicente, I. M. C., & Oleas, R. (s/f). Escuela superior politécnica de chimborazo facultad de ciencias pecuarias escuela de ingeniería zootécnica. Edu.ec. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2105/1/17T1103.pdf>
- [30] Zullo, G., Alberio, G., Neglia, G., de Canditiis, C., Bifulco, G., Campanile, G., & Gasparrini, B. (2016). L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro–produced embryos. *Theriogenology*, 85(4), 688–697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.008>

- [31] Hartman, P. E. (1990). [32] Ergothioneine as antioxidant. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*, 310–318. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86124-e](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86124-e)
- [32] Palma, G. A. (2018). *Biología de la Reproducción*. Ediciones INTA. https://www.researchgate.net/publication/329567703_Produccion_in_vitro_de_embriones_bovinos.
- [33] Peña J, M., Góngora O, A., & Estrada L, J. (2007). Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1). <https://doi.org/10.21897/rmvz.439>
- [34] Herradón, P., Quintela, L, A., Becerra, J.J., Ruibal, S., & Fernández, M. (2007). Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Producción animal*, 15, p. 34. <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/53061/1/la07027.pdf>.
- [35] López C, A., Olivera A, M., Ruiz C, T., & Tarazona M, A. (2007). Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2). <https://doi.org/10.21897/rmvz.428>
- [36] Robledo, J.M., Herrera, J., Cajero, M., Navarro, M.C., & García, A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, p. 95 - 99. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243009>.
- [37] Ferré, L., & Cattaneo, L.. (2013). Biotecnologías reproductivas: producción in vitro de embriones y semen sexado. *Medicina Veterinaria*, 2, pp. 28 - 36. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/38-biotecnologias.pdf.
- [38] Rodríguez, P y Jiménez, C. (2011). *Criopreservación de embriones bovinos producidos in vitro*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
- [39] Celestinos, M., & Gatica, R. (2002). Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos de medicina veterinaria*, 34(2). <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2002000200002>

- [40] Cabrera, P., & Fernández, A. (2006). Criopreservación de embriones: una herramienta básica en la Reproducción Asistida. Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV, 47.
- [41] Guerra, R.; Solis, A., Sandoya, G., & de Armas, R. (2012). Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. REDVET, 13(10). <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=63624631005>.
- [42] Sanches, B. (2015). Obtenção de prenhez em rebanhos bovinos a partir de embriões produzidos in vitro criopreservados por vitrificação ou transferência direta. Universidad estatal de Londrina, p. 13.
- [43] Segura, J., & Montes, R. (2001). Reasons and strategies for the conservation of animal genetic resources. Rev. Biomed, 12(3), pp. 196 - 206.
- [44] B, Sanches., L, Marinho., B., Filho., J, Pontes., A, Basso., M, Meirinhos., K, Silva-Santos., C, Ferreira., & M, Seneda. (2013). Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived Bos indicus embryos to forskolin before vitrification. Elsevier, p. 373.
- [45] J. Caínzos, M. Barrio, S. Ruibal, J.J. Becerra, L.A. Quintela1 y P.G. Herradón. (2013). Efecto de la suplementación con suero fetal bovino (FCS), albúmina sérica bovina (BSA) y polivinil pirrolidona (PVP) en el medio de maduración in vitro de los ovocitos bovinos. ITEA, 109(1), pp. 25 – 32. https://www.researchgate.net/publication/265550077_Efecto_de_la_suplementacion_con_suero_fetal_bovino_FCS_albumina_serica_bovina_BSA_y_polivinil_pirrolidona_PVP_en_el_medio_de_maduracion_in_vitro_de_los_ovocitos_bovinos#fullTextFileContent.
- [46] Limache Coaquera, T. (2015). Efecto de la adición de fluido folicular al medio de maduración de ovocitos para la producción In vitro de embriones de bovino (Bos taurus). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
- [47] Castrillón Martínez, Diana Carolina. (2017). Caracterización de las sericina de seda colombiana con miras a ser incorporada como ingrediente en una matriz alimentaria. Universidad Pontificia Bolivariana.
- [48] Do, L., Namula, Z., Luu, V., Sato, Y., Taniguchi, M., Isobe, T., Kikuchi, K. y Otoi, T. (2014), Efecto de la suplementación con sericina durante in vitro Maduración en la

maduración, fertilización y desarrollo de ovocitos porcinos. *Reprod Dom Anim*, 49: e17-e20. doi: 10.1111 / rda.12274

[49] Misa Hosoe, N. Y. (2014). La sericina acelera la producción de hialuronano y disminuye la incidencia de fertilización por poliespermia en ovocitos bovinos durante la maduración in vitro. *Revista de Reproduccion y Desarrollo*.

[50] El-Fakharany, E. M., Abu-Elreesh, G. M., Kamoun, E. A., Zaki, S., & Abd-EL-Haleem, D. A. (2020). In vitro assessment of the bioactivities of sericin protein extracted from a bacterial silk-like biopolymer. *RSC Advances*, 10(9), 5098–5107. <https://doi.org/10.1039/c9ra09419a>

[51] Isobe, T., Ikebata, Y., Onitsuka, T., Wittayarat, M., Sato, Y., Taniguchi, M., & Otoi, T. (2012). Effect of sericin on preimplantation development of bovine embryos cultured individually. *Theriogenology*, 78(4), 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.021>

[52] Isobe, T., Ikebata, Y., Onitsuka, T., Do, L. T. K., Sato, Y., Taniguchi, M., & Otoi, T. (2013). Cryopreservation for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin. *Cryobiology*, 67(2), 184–187. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.010>

[53] Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2011). Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(3), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.06.049>

[54] Hussein, M.A., 2011. A convenient mechanism for the free radical scavenging activity of resveratrol. *International Journal of Phytomedicine*, 3(4), pp.459–469.

[55] Zullo, Gianluigi. (2015). Natural antioxidants during in vitro culture improve embryo quality in cattle. *Università degli Studi di Napoli Federico II*. <https://doi.org/10.6092/UNINA/FEDOA/10174>

[56] Harvey, A. J., Kind, K. L., & Thompson, J. G. (2002). REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, 123(4), 479–486. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230479>

[57] Goto, Y., et al., Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 1993. 15(1): p. 69-75.

- [58] Lee, H.C. and Y.H. Wei, Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* (Maywood). 2007. 232(5). p. 592-606.
- [59] Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol.*, 1989. 2(2): p. 195-256.
- [60] Khalil, W.A., W.F.A. Marei, and M. Khalid, Protective effects of antioxidants on linoleic acid-treated bovine oocytes during maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*. 80(2): p. 161-168.
- [61] Ali, A.A., J.F. Bilodeau, and M.A. Sirard, Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 2003. 59(3-4): p. 939-49.
- [62] Li, X. X., Lee, K. B., Lee, J. H., Kim, K. J., Kim, E. Y., Han, K. W., Park, K. S., Yu, J., & Kim, M. K. (2014). Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 81(2), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.030>
- [63] Abeydeera, L.R., et al., Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*, 1998. 50(5): p. 747-56.
- [64] Michael, A., et al., Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. 68(2): p. 204-212.
- [65] Olfati Karaji, R., Daghigh Kia, H., & Ashrafi, I. (2014). Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze–thaw bull sperm. *Cell and Tissue Banking*, 15(3), 461–470. <https://doi.org/10.1007/s10561-013-9412-y>
- [66] Castillo-Martín, M., Yeste, M., Soler, A., Morató, R., & Bonet, S. (2015). Addition of L-ascorbic acid to culture and vitrification media of IVF porcine blastocysts improves survival and reduces HSPA1A levels of vitrified embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(7), 1115. <https://doi.org/10.1071/rd14078>

- [67] Bormann, C. L., Onger, E., & Krisher, R. L. (2003). The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 59(5–6), 1373–1380. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01181-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01181-0)
- [68] Guemra, S., Monzani, P., Santos, E., Zanin, R., Ohashi, O., Miranda, M., & Adona, P. (2013). Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(6), 1616–1624. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352013000600005>
- [69] Bernal, B., Tribulo, B., Mutto, H., Adrián A., & Almicar, G. (2016). Influencia de la suplementacion del medio de maduración y de cultivo en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos in vitro. *RedVet*, 18(11), p.p 1 – 11.
- [70] Rojano, B., Gaviria, C., Gil, M., Saez, J., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia*, p. 173-181.
- [71] Gastaldi, B., Silvia, B., & Catalán, C. (2019). Análisis de los compuestos fenólicos y volátiles de plantas medicinales y aromáticas del noroeste de la Patagonia Argentina, estudio de las actividades antioxidante y citotóxica. *Conicet*.
- [72] De Wit, A., Wurth, Y., & Kruij, T. 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science*, 78(5), pp.1277–1283.
- [73] Newcombe, R. G. (1998). Interval estimation for the difference between independent proportions: comparison of eleven methods. *Statistics in Medicine*. 17, p.p 873-890.
- [74] Lino, A. A., Chasi, B. E. (2021). Efecto de dos medios de maduración sobre la producción de embriones partenogénéticos en bovinos. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano*.
- [75] Maturana, D., Gómez O., J., & Restrepo B., G. (2019). Efecto de la quercetina sobre la tasa de desarrollo y la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 775–786. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16181>

- [76] Espin, P., (2018). Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes. Universidad Politécnica Salesiana.
- [77] García-Díaz, J.R., Romero-Aguirregomezcorta, J, Astiz Blanco, S, & Ruiz López, S. (2013). Adición de sustancias antioxidantes en los medios de cultivo empleados en la producción in vitro de embriones en mamíferos. *Revista de Salud Animal*, 35(1), p.p 10-19.
- [78] Do, L., Namula, Z., Luu, V., Sato, Y., Taniguchi, M., Isobe, T., Kikuchi, K., & Otoi, T. (2014). Effect of Sericin Supplementation During In Vitro Maturation on the Maturation, Fertilization and Development of Porcine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), e17-e20. <https://doi.org/10.1111/rda.12274>
- [79] Restrepo Betancur, G., & Rojano, B. A. (2017). Efecto del isoespintanol y el timol en la actividad antioxidante de semen equino diluido con fines de congelación. *Revista de Medicina Veterinaria*, 35, 149–158. <https://doi.org/10.19052/mv.4397>
- [80] Mona Ghasemi M.Sc., Abbas Farshad Ph.D., Hadi Hajarian Ph.D., Omid Banafshi M.Sc., Vahideh Asadollahi M.Sc., Fardin Fathi Ph.D. (2018). The effects of sericin on cryopreserved sperm cells and subsequent embryo development in mice. *Int J Reprod BioMed Vol. 16. No. 6. p.p 405-412.*
- [81] Sasaki, M., Kato, Y., Yamada, H., & Terada, S. (2005). Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42(Pt 2), 183–188. <https://doi.org/10.1042/BA20050019>
- [82] Restrepo, G., Usuga, A., Montoya, J., Rojas, M., & Rojano, B. (2018). Flow cytometric analysis of stallion semen frozen with isoespintanol. *CRYO 2020*.
- [83] Restrepo, G., Usuga, A., Montoya, J., Rojas, M., & Rojano, B. (2020). Isoespintanol effect on freezing of stallion semen. *Revista Acovez*, Vol. 49, N° 3. ISSN0120-1530.
- [84] Miyamoto, Y., Oishi, K., Yukawa, H., Noguchi, H., Sasaki, M., Iwata, H., & Hayashi, S. (2012). Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplantation*, 21(2–3), 617–622. <https://doi.org/10.3727/096368911X605556>
- [85] Madrid, S.(2016). Efecto del resveratrol sobre la criotolerancia de embriones bovinos in vitro. Universidad Nacional de Colombia.

[86] Avendaño Arteaga, Y., Hincapié Llanos, G. A., Castrillón Martínez, D., Cardona Aristizábal, M., Barajas Gamboa, J. A., & Álvarez López, C. (2018). Propiedades de la sericina de seda colombiana. *Revista Lasallista de Investigación*, 15(1), 57–66. <https://doi.org/10.22507/rli.v15n1a5>

[87] Correa-Rivero, H., Díaz-Casañas, E., Bernal Veitia, O., & Malvarez Fernández, Y. (2020). Determinación de la estabilidad e irritabilidad del hidrolizado de sericina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 49(2). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n2.88917>

[88] Hajarian, H., Aghaz, F., & Karami Shabankareh, H. (2017). Replacement of serum with sericin in vitro maturation and culture media: Effects on embryonic developmental competence of Sanjabi sheep embryo during breeding season. *Theriogenology*, 92, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.027>

[89] Quintanilla M., L., Huanca L., W., Córdova G., A., Ampuero B., A., & Benavides I., L. (2015). Efecto de la Suplementación del Medio de Maduración con Cisteamina y de Dos Medios de Cultivo (KSOMaa y SOF) en la Fecundación in vitro de Ovocitos Bovinos. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 26(3), 462. <https://doi.org/10.15381/rivpep.v26i3.11178>

[90] Ferreira, I. (2014). La controversia en torno a los antioxidantes y los prooxidantes. *Nutri-Facts*.

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

[92] Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., & Farin, C. E. (2000). Ultrastructural Morphometry of Bovine Compact Morulae Produced In Vivo or In Vitro. *Biology of Reproduction*, 62(5), 1459–1465. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1459>

[93] Kuzmany, A., Havlicek, V., Wrenzycki, C., Wilkening, S., Brem, G., & Besenfelder, U. (2011). Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under

different conditions. *Theriogenology*, 75(3), 482–494.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.016>

[94] Garcia, S. M., Marinho, L. S. R., Lunardelli, P. A., Seneda, M. M., & Meirelles, F. V. (2015). Developmental block and programmed cell death in *Bos indicus* embryos: Effects of protein supplementation source and developmental kinetics. *PLoS One*, 10(3), e0119463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119463>

[95] Magalhães, R., Guaitolini, C. R. de F., Tramontin, M. L. D., Sestari, D. A. O., Barros, B. A. de, Elias, A. S. de L., Araujo, A. L., Giosa, D. C., Trindade, A. B., & Maziero, R. R. D. (2021). Evaluation of *in vitro* production rates of bovine embryos using melatonin-supplemented culture medium. *Research, Society and Development*, 10(6), e19010615544. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15544>

[96] De Wit, a. a C., Wurth, Y. a. & Kruip, T. a M., 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science*, 78(5), pp.1277–1283.

[97] Dode, M. a N. et al., 2002. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science*, 69(1–2), pp.15–23.