

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EFECTO DEL RESVERATROL EN LA CALIDAD DE
EMBRIONES *IN VITRO* GENERADOS POR SEPARACIÓN DE
BLASTOMERAS EN BOVINOS”**

**Autor(a): Bach. Gleni Tatiana Segura Portocarrero
Asesor(a): M.Sc. Mónica Marcela Ramírez Hernández**

Registro:

CHACHAPOYAS – PERÚ

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“EFECTO DEL RESVERATROL EN LA CALIDAD DE
EMBRIONES *IN VITRO* GENERADOS POR SEPARACIÓN DE
BLASTOMERAS EN BOVINOS”**

Autor(a): Bach. Gleni Tatiana Segura Portocarrero
Asesor(a): M.Sc. Mónica Marcela Ramírez Hernández

Registro:

CHACHAPOYAS – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios ante todo por brindarme un día más de vida y por ser mi guía espiritual.

A mi madre por su apoyo y cariño incondicional en momentos buenos y malos por siempre estar ahí para mí cuando necesito su presencia.

A una persona especial Jenin Víctor Cortez Polanco por su apoyo y por haber sido mi fuerza para superar cada reto que me ha puesto la vida en lo personal y profesional.

A mis hermanos mayores (Oimer, Jheyner y Llique) por su cariño y confianza en mí.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas por mi formación profesional.

Al Pas rector el PhD. Jorge Luis Maicelo Quintana por sus labores realizadas en su mandato como rector mediante la creación de Laboratorios de última tecnología que facilitaron mi educación y me permitieron realizar con éxito la tesis.

A la facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología por su formación académica.

Al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología, por el apoyo en el financiamiento para la realización de la tesis.

A mi asesora M.Sc. Mónica Marcela Ramírez Hernández, por su confianza, apoyo incondicional y paciencia en el desarrollo de esta tesis.

A mi maestro Biólogo Jenin Víctor Cortez Polanco, por sus enseñanzas y apoyo académico en la realización de los ensayos de laboratorio.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

RECTOR DE LA UNIVERSIDAD

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Dr. MANUEL EMILIO MILLA PINO

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS

El docente del Politécnico Jaime Isaza Cadavid Colombia que suscribe, hace constar que ha asesorado la realización de la tesis titulada “EFECTO DEL RESVERATROL EN LA CALIDAD DE EMBRIONES IN VITRO GENERADOS POR SEPARACIÓN DE BLASTOMERAS EN BOVINOS”; del tesista de grado de maestría en producción animal de la escuela de posgrado de esta casa superior de estudios:

- GLENI TATIANA SEGURA PORTOCARRERO

El suscrito da el visto bueno al informe de la mencionada tesis, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el jurado evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de las observaciones dadas por el jurado evaluador, para su posterior sustentación.

Chachapoyas, 15 de enero del 2019



M.Sc. Mónica Marcela Ramírez Hernández

Asesor

JURADO EVALUADOR



M. Sc. Wilmer Bernal Mejia

PRESIDENTE



M. Sc. Reiner Pedro Gabriel Reategui Inga

SECRETARIO



Dr. Raúl Rabanal Oyarce

VOCAL



ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En la ciudad de Chachapoyas, el día 21 de febrero del año 2019, siendo las 1:00 pm horas, el aspirante: Gleni Tatiana Segura Portocarrero defiende públicamente la tesis titulada: "Efecto del Resveratrol en la calidad de embriones in vitro generados por separación de blastómeros en bovinos."

para optar el grado de maestro en:

Ciencias en Producción Animal

otorgado por la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el jurado, constituido por:

Presidente: M.Sc. Wilmer Bernal Mejía

Secretario: M.Sc. Reiner Pedro Gabriel Reategui Inga

Vocal: Dr. Raul Rabanal Oyarce.

Procedió el aspirante a hacer la exposición de los antecedentes, contenido de la tesis y conclusiones obtenidas de la misma, haciendo especial mención de sus aportaciones originales.

Terminada la defensa de la tesis presentada, los miembros del jurado pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones u objeciones consideran oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

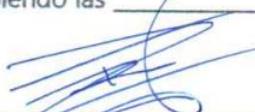
Tras la intervención de los miembros del jurado y las oportunas contestaciones del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los miembros del jurado presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

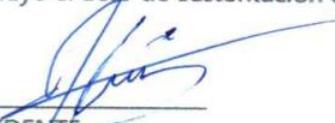
Seguidamente, a puerta cerrada, el jurado determinará la calificación global concedida a la tesis, en términos de:

- a) (19-20) Excelente.
- b) (17-18) Muy Bueno.
- c) (15-16) Bueno.
- d) (14) Aprobado.
- e) (0-13) Desaprobado.

Otorgada la calificación de Dieciséis y el presidente del Jurado comunica, en sesión pública, la calificación concedida. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las _____ horas del mismo día, el jurado concluye el acto de sustentación de la tesis.


SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL


ASESOR

OBSERVACIONES:

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo, Gleni Tatiana Segura Portocarrero con DNI N° 47882777 estudiante de la maestría en Ciencias en Producción Animal de la escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

- Soy autor de la tesis titulada:
"Efecto del resveratrol en la calidad de embriones in vitro generados por separación de blastomeras en bovinos"
La misma que presento para optar:
El grado de Maestro en Ciencias en Producción Animal
- La tesis no ha sido plagia total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
- La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
- La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
- Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente, asumimos las consecuencias y sanciones que nuestras acciones deriven, sometiéndose a la normativa vigente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Chachapoyas 10 de abril del 2019



Gleni Tatiana Segura Portocarrero
DNI N°47882777

ÍNDICE

	pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II.MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. Lugar y fecha de ejecución	5
2.2. Colecta de ovarios y aspiración de los ovocitos	5
2.3. Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos	5
2.4. Fertilización <i>in vitro</i> de los ovocitos	6
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de los cigotos	7
2.6. Separación de blastomeras y cultivo en WOW	7
2.7. Tinción de yoduro de propidio (PI) (células muertas) y flurescein diacetate (FDA)	7
III.RESULTADOS	9
IV.DISCUCIÓN	12
V.CONCLUSIONES	14
VI.REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA	15
VII.ANEXOS	19

ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clivaje y producción de embriones de 8 a 10 blastomeras a los tres días de cultivo según la concentración de resveratrol.....	9
Tabla 2. Blastocistos producidos post separación de blastomeras a los seis días de cultivo según la concentración de resveratrol.....	10
Tabla 3. Cantidad de células totales y células vivas en blastocistos obtenidos post separación de blastomeras a los seis días de cultivo con dos concentraciones de resveratrol.....	11

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Identificación de ovocito maduro con tinción Hoechst.....	6
Figura 2. Ovocitos de categoría A y B inmaduros y madurados por 24 horas...	6
Figura 3. Embriones despojados de su zona pelucida y la separación de sus blastomeras para ser cultivados en WOW cada cuatro blastomeras.....	7
Figura 4. Embriones cultivados por 3 días en concentraciones de 2 μ M y 0.5 μ M de resveratrol, presentando entre ocho a diez blastomeras..	9
Figura 5. Blastocistos producidos post separación de blastomeras a los seis días de cultivo.....	10
Figura 6: Determinación de células totales con tinción Hoechst en blastocistos.....	11

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- SFB: Suero fetal bovino.
BSA: Suero de albumina bovina.
MIV: Maduración *in vitro*.
FIV: Fecundación *in vitro*.
CIV: Cultivo *in vitro*.
FSH: Hormona folículo estimulante. .
LH: Hormona luteinizante.
SOF: Fluido sintético de oviducto.
ZP: Zona pelúcida.
COCs: Complejos ovocito-cúmulus.
TCM: Medio de cultivo tisular.
EGF: Factor de crecimiento epidermal.
WOW: Well of the Well.
PI: Ioduro de propidio.
FDA: Fluorecin diacetate.

RESUMEN

El estado oxidativo es un factor importante que determina el desarrollo de embriones bovinos. El objetivo en este estudio fue evaluar el efecto del resveratrol en la calidad de embriones *in vitro* generados por separación de blastomeras en ganado bovino. Ovocitos provenientes de matadero fueron madurados y fecundados *in vitro* por el método convencional. Terminada las 18 horas de fecundación, los cigotos se cultivaron por 3 días en medio fluido oviductual sintético (SOF) para el control y suplementado con 2 μ M y 0.5 μ M para los tratamientos. Al día 3 se despojaron de su zona pelúcida (ZP) para ser cultivados a razón de cuatro blastomeras en well of the well (WOW) por 6 días en medio SOF suplementado con resveratrol. Se evaluó datos porcentuales de clivaje y división embrionaria (8 a 10 blastómeros) a los 3 días de cultivo superando la suplementación con 0.5 μ M de resveratrol ($p < 0.05$). A los 6 días post separación de blastomeras se evaluó porcentaje de embriones, cantidad de células totales, células vivas y células muertas utilizando la tinción Hoechst, FDA y PI respectivamente. No hubo diferencias en el porcentaje de blastocistos entre tratamientos; sin embargo, la suplementación con 0.5 μ M de resveratrol al medio SOF tuvo mayor cantidad de células totales y células vivas ($p < 0.05$). Finalmente la suplementación con resveratrol al medio SOF no aumenta el porcentaje de blastocistos pero si mejora su calidad usando una concentración de 0.5 μ M.

Palabras claves: Clivaje, desarrollo embrionario, células totales, células vivas.

ABSTRACT

The oxidative state is an important factor that determines the development of bovine embryos. The objective in this study was to evaluate the effect of resveratrol on the quality of in vitro embryos generated by separation of blastomeres in cattle. Oocytes from the slaughterhouse were matured and fertilized in vitro by the conventional method. After 18 hours of fertilization, the zygotes were cultured for 3 days in synthetic oviductal fluid medium (SOF) for control and supplemented with 2 μ M and 0.5 μ M for the treatments. On day 3 they were stripped of their zona pellucida (ZP) to be cultivated at a rate of four blastomeres in well of the well (WOW) for 6 days in medium SOF supplemented with resveratrol. We evaluated percentage data of cleavage and embryonic division (8 to 10 blastomeres) after 3 days of culture, finding a significant difference $p < 0.05$ with supplementation with 0.5 μ M of resveratrol. At 6 days after blastomere separation, percentage of embryos, number of total cells, live cells and dead cells were evaluated using Hoechst, FDA and PI staining respectively. There were no differences in the percentage of blastocysts between treatments; however, supplementation with 0.5 μ M of resveratrol to the SOF medium had a greater amount of total cells and living cells ($p < 0.05$). In conclusion, supplementation with resveratrol in the SOF medium does not increase the percentage of blastocysts but improves its quality using a concentration of 0.5 μ M.

Keywords: Clivage, embryonic development, total cells, living cells.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran competitividad en el sector ganadero, se busca en todo momento producir en cantidad y calidad, siendo este un motivo importante para el uso de biotecnologías reproductivas. La producción de embriones *in vitro* es una biotecnología reproductiva empleada a nivel mundial, por sus diversas aplicaciones en la mejora genética animal, sin embargo la baja tasa de desarrollo embrionario *in vitro* causada por diversos factores como la mala calidad de los gametos, anomalías cromosómicas, desacoplamiento de telomeros y condiciones de cultivo que no son óptimas que inducen el estrés oxidativo están siendo una gran limitante en la producción de embriones *in vitro* como herramienta reproductiva y posterior aplicación en la mejora genética. Los embriones producidos *in vitro* son muy susceptibles al estrés oxidativo, y consecuentemente tienen problemas en su desarrollo. El estrés oxidativo ha sido relacionado con diferentes tipos de lesiones celulares, peroxidación de lípidos de membrana, oxidación de aminoácidos y ácidos nucleicos, apoptosis y necrosis que posteriormente disminuyen la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* (Johnson y Nasr-Esfahani, 1994; Kitagawa, Suzuki, Yoneda, Watanabe, 2004).

La oxidación es el proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación) y reducción a aquel otro en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. Son reacción de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados (Chang, 1992; Voet, 1992).

Siendo el oxígeno imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO) que dañan las macromoléculas como son: lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, conjuntamente alteran los procesos celulares como la funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, etc.) (Roche y Romero, 1997a).

Un exceso de radicales libres (RL), que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital son extraordinariamente reactivos, rompen el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo. Se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, etc (Roche y Romero, 1997b). De los RLO inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular O_2 , el radical-anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^-) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo (ROO^-), el hidroperóxido orgánico ($ROOH$) y los lípidos peroxidados (Pryor, 1994).

En el otro lado de la balanza que debe mantenerse en equilibrio están los antioxidantes (sustancias con capacidad para oponerse a la acción del oxígeno y de ciertas especies oxidantes, independientemente de su mecanismo). Hay sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar los RL generados en los procesos redox celulares (la catalasa de los peroxisomas, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa), también hay multitud de antioxidantes no enzimáticos (Veiga, Aguilar, Clavo, Llanes, 1997).

La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la necrosis y la apoptosis. La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. En estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que in vivo favorece la aparición de procesos inflamatorios. Por otra parte, la muerte celular por apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea porque el organismo requiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y la célula muere en beneficio del organismo. En este caso, la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso (Evan y Littlewood, 1998).

El resveratrol es un polifenol natural presente en numerosas plantas y frutos como cacahuetes, moras, arándanos y, sobre todo, en la uva y el vino tinto. (Gambini et al., 2013). Recientemente se ha observado un aumento en el interés por el resveratrol tras los hallazgos beneficiosos sobre la quimioprevención, la cardioprotección, los procesos inflamatorios y varios aspectos del metabolismo, aumentando la vida útil de varios organismos, desde levaduras hasta vertebrados (Pirola y Frojdo, 2008). Mediante este descubrimiento se han realizado varios estudios con el objetivo de identificar funciones biológicas del resveratrol en la reproducción de mamíferos (Kwak, Cheong, Jeon, Lee, Choi, 2012; Huang, Shiao, Hsuuw, Chan, 2007).

La adición de resveratrol como suplemento a los medios de cultivo en la producción de embriones *in vitro* es utilizado en diversas especies. En su investigación Giaretta, Spinaci, Bucci, Tamanini, Galeati, 2013, adicionaron 2µM de resveratrol en soluciones de MIV mejorando y optimizando la calidad y resistencia de los ovocitos porcinos a las crioconservación. Lee, Wang, Chaille, Machaty, 2010, utilizaron el resveratrol a un concentración de 0.5µM obteniendo un efecto beneficioso sobre el desarrollo de preimplantación que conduce a la formación de blastocistos y una mejor calidad del embrión. En bovinos la adición de resveratrol al medio CIV o medio de vitrificación ayudo a los embriones a recuperar parcialmente su estado inicial en el proceso de vitrificación y calentamiento (Gaviria et al., 2018) y en ratones promueve la calidad de los ovocitos al prevenir el daño al ADN (Liu et al., 2013).

La técnica de separación de blastómeras es utilizada como una herramienta para aumentar la producción de células embrionarias (embriones) (Johnson, Loskutoff, Plante, Betteridge, 1995).

Sin embargo, no se ha probado los beneficios que el resveratrol puede tener en el proceso de producción de embriones *in vitro* por la técnica de separación de blastómeras, con la finalidad de aumentar los porcentajes y la calidad de los embriones producidos *in vitro* y de esta manera brindar un beneficio social dando a menor costo los embriones y mejorando la genética a

nivel regional y del país. Por lo que el objetivo general fue evaluar el efecto del resveratrol en el porcentaje y calidad de embriones *in vitro* generados por separación de blastomeras en ganado bovino.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Animal Reproducción y mejoramiento genético del Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología en la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas y tuvo lugar el año 2017.

2.1. Colecta de ovarios y aspiración de los ovocitos

Todos los medios y reactivos usados fueron de Sigma - Aldrich (St Louis, MO, USA) a menos que se señale lo contrario. Se colectaron ovarios de vacas cruce con Brown Swiss, con un rango de edades de 1 a 4 años y fisiológicamente sanas. Los ovarios fueron recolectados en el centro de beneficio de la ciudad de Chachapoyas de vacas beneficiadas con la ayuda de una tijera y posteriormente transportados al laboratorio en un recipiente isotérmico conteniendo cloruro de sodio al 0.9% (wt/vol) con 0.025 mg/mL de estreptomicina, temperado a 37 °C. Se aspiraron los folículos de tamaño medio (de 2 a 6mm) usando una jeringa de 10mL y una aguja de 18 G con medio de manipulación HEPES suplementado con 50 mg/mL de gentamicina y 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB).

2.2. Maduración *in vitro* de los ovocitos

Los ovocitos con citoplasma homogéneo y varias capas de células de cúmulos compactos fueron seleccionados (Figura 2A) (Liebfried y First, 1979; Sato, Matsuo, Miyamoto, 1990) para posteriormente ser madurados *in vitro* por 24 horas en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ a 38.5 °C (Figura 1), en placas de 4 celdas (NUNC, USA) en medio de maduración TCM199 suplementado con 0.25 mg/mL de piruvato de sodio, 50 ug/mL de gentamicina, 0.01UI/mL de hormona folículo estimulante (FSH), 0.01UI/mL de hormona luteinizante (LH), 0.1mg/mL de glutamina, 10ng/mL factor de crecimiento epidermal (EGF), 1ug/mL de 17β-estradiol y 10% SFB.

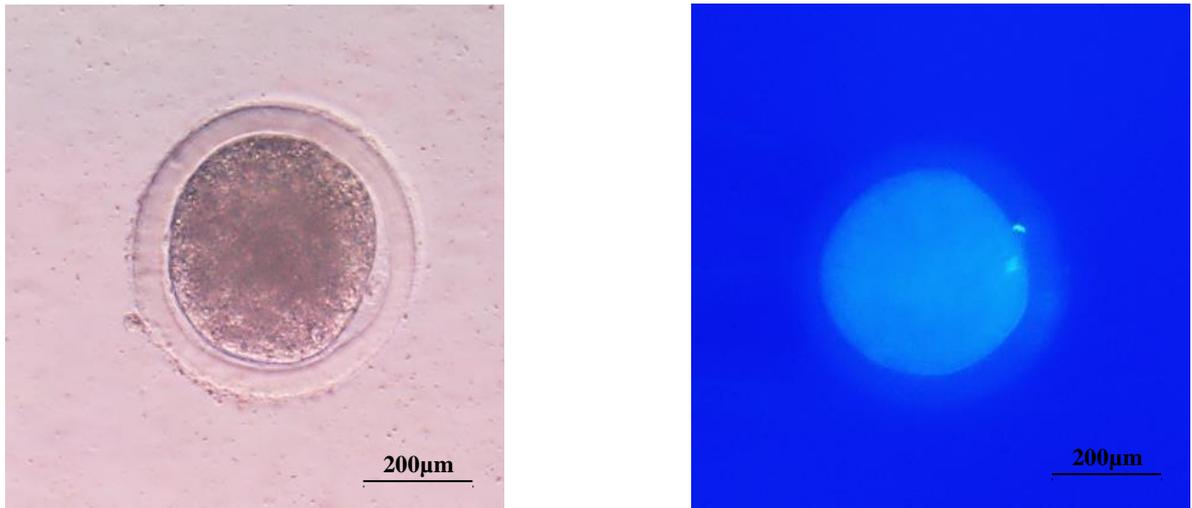


Figura 1: Identificación de ovocito maduro con tinción Hoechst

2.3. Fertilización *in vitro* de los ovocitos

Para la fertilización se usó semen nacional congelado de la raza Brangus. Espermias móviles fueron lavados, seleccionados y capacitados por el método de Percoll (Parrish, Krogenaes, Susko-Parrish, 1995) y adicionados al medio de fecundación TALP-FIV (Vajta et al., 2000), suplementado con 0.25 mg/mL de piruvato de sodio, 50 ug de gentamicina, 0.03mg/mL de heparina y 3 mg/mL de suero de albumina bovina factor cinco (BSAV). Los ovocitos madurados (Figura 2B) y los espermatozoides capacitados se incubaron por 18 horas en una atmosfera humidificada a 38.5°C con 5% CO₂.

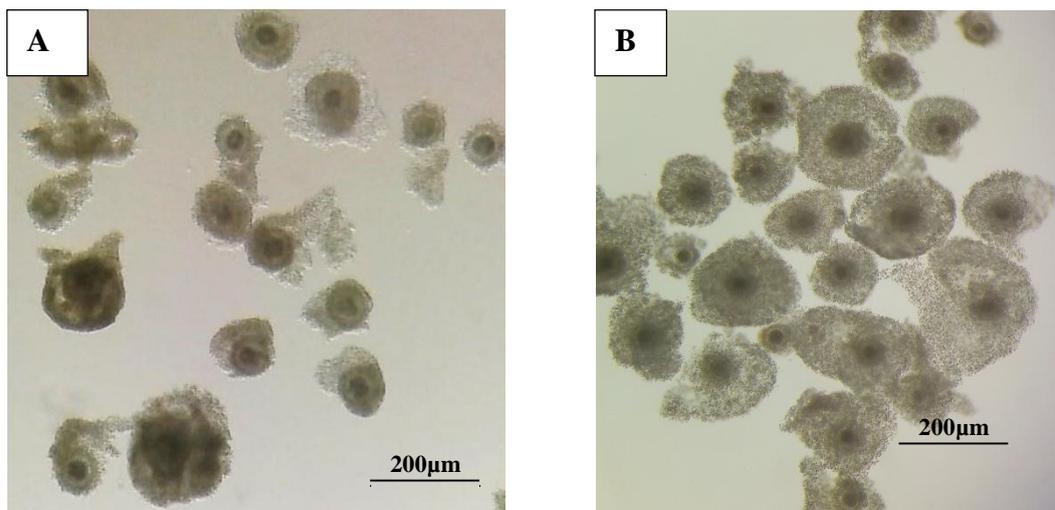


Figura 2: Ovocitos de categoría A y B inmaduros (A); ovocitos madurados por 24 horas (B).

2.4. Cultivo *in vitro* de los cigotos

Se cultivaron los cigotos en grupos de 25 en una placa de cuatro pocillos durante tres días a 38.5°C, con mezcla de gases, utilizando el medio SOF base (Vajta et al., 2000) suplementado con 0.044g/l de piruvato de sodio, 0.039g/l de L-glutamina, 3.0mg/mL de Suero Albumina Bovina (BSA-FAF), 1X de amino ácidos esenciales, 1X de amino ácidos no esenciales, 10mg/mL de EGF, 0.1mg/mL de ácido cítrico, 0.5mg/mL de myo-inositol, 50µg/mL de gentamicina, 2% de SFB y con dos concentraciones de resveratrol de 2µM y 0.5µM

2.5. Separación de blastomeras y cultivo en WOW

Los embriones de tres días de cultivo con ocho a diez blastomeras fueron despojados de su zona pelúcida con 0,2% de pronasa en Hepes-buffered SOF para ser cultivados en WOW (pocillos hechos manualmente con un punzón) a razón de cuatro blastomeras por pocillo, con el medio de cultivo mencionado anteriormente y suplementado con concentraciones de 2µM y 0.5µM de resveratrol, posteriormente se colocaron en la incubadora de CO₂ por 6 días.

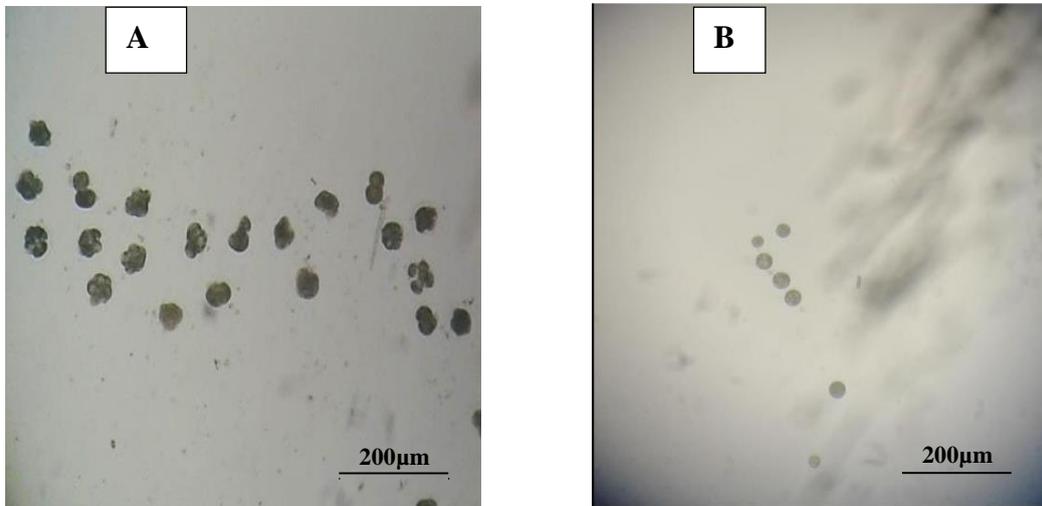


Figura 3: Embriones despojados de su zona pelúcida (A), separación de sus blastomeras para ser cultivados en WOW cada cuatro blastómeros (B).

2.6. Tinción de yoduro de propidio (PI) (células muertas) y fluorescein diacetate (FDA) (células vivas) y Hoechst (células totales).

Pasados los seis días los embriones fueron colocados en medio de tinción compuesto

por Phosphate Buffered Saline-Alcohol Polivinílico suplementado con 1.0mg/mL de PI, 1.0mg/mL de FDA y 1.0mg/mL de Hoechst para luego ser llevados a incubación por 10 minutos y posteriormente ser examinados con ayuda de un microscopio invertido con fluorescencia (Olympus, Japón).

Análisis estadístico

Los datos de clivaje, desarrollo embrionario, producción de embriones, cantidad de células totales y células vivas obtenidos en las 4 repeticiones por tratamiento (2 μ M, 0.5 μ M) y grupo control se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) en un diseño completamente al azar (DCA) usando el software estadístico **Statistix 16.0** (SPSS Inc, 2007).

III. RESULTADOS

La suplementación con resveratrol al día 3 de cultivo no altero la tasa de clivaje (50, 52 y 52%); sin embargo la suplementación de resveratrol con 0.5 μ M fue significativamente superior ($p < 0.05$) en 4% respecto a los otros grupos en número de embriones de 8 a 10 blastómeros (Tabla 1, Figura 4).

Tabla 1. Clivaje y producción de embriones.

Grupo	N° ovocitos	Embriones en el día 3			
		N° emb. clivados \pm E.E.M	% Emb. clivados	N° de emb. 8-10 blast. \pm E.E.M	% Emb. 8-10 blast.
2 μ M	300	149 \pm 1.1 ^a	50	67 \pm 0.4 ^b	22
0.5 μ M	300	156 \pm 0.7 ^a	52	77 \pm 0.4 ^a	26
Control	300	155 \pm 0.9 ^a	52	66 \pm 0.5 ^b	22

a, b; letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), \pm error estándar de la media

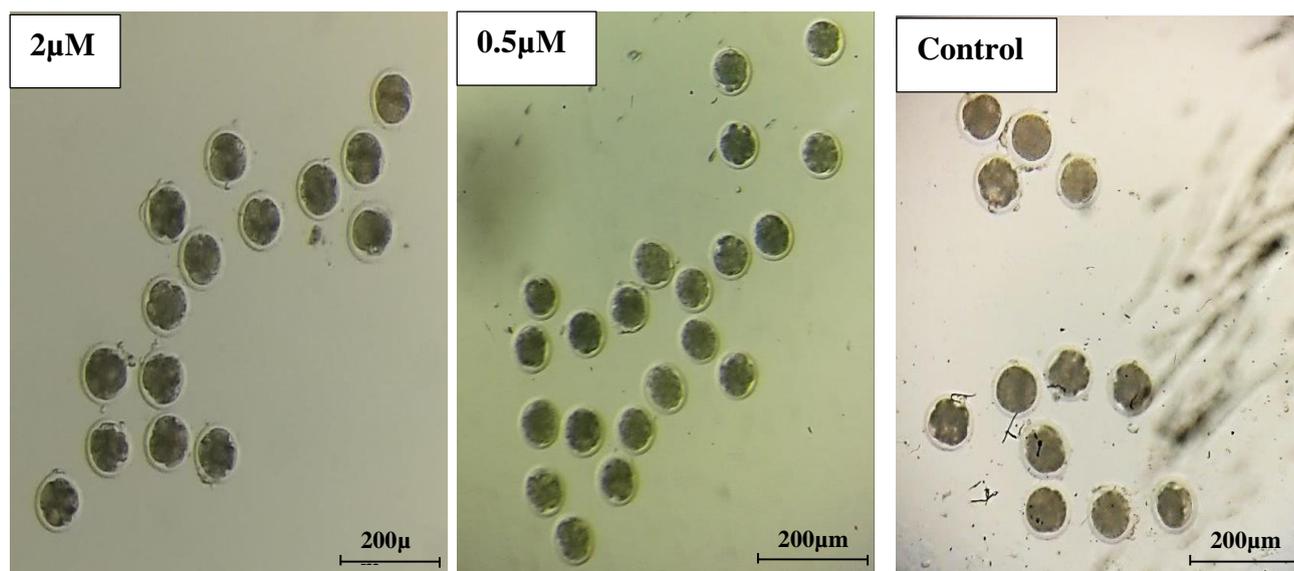


Figura 4: Embriones cultivados por 3 días en concentraciones de 2 μ M, 0.5 μ M de resveratrol y grupo control presentando entre ocho a diez blastómeros.

Tabla 2. Blastocistos producidos post separación de blastomeras a los seis días de cultivo según la concentración de resveratrol y grupo control.

Grupo	N° de emb. Cultivados en WOW (4 blast.)	N° Blast. post separación de blastomeras (\pm E.E.M) ¹	% Blast. Post separación de blastomeras
2 μ M	86	37 \pm 0.3	43
0.5 μ M	98	45 \pm 0.2	46
Control	88	36 \pm 0.5	41

¹ \pm Error estándar de la media

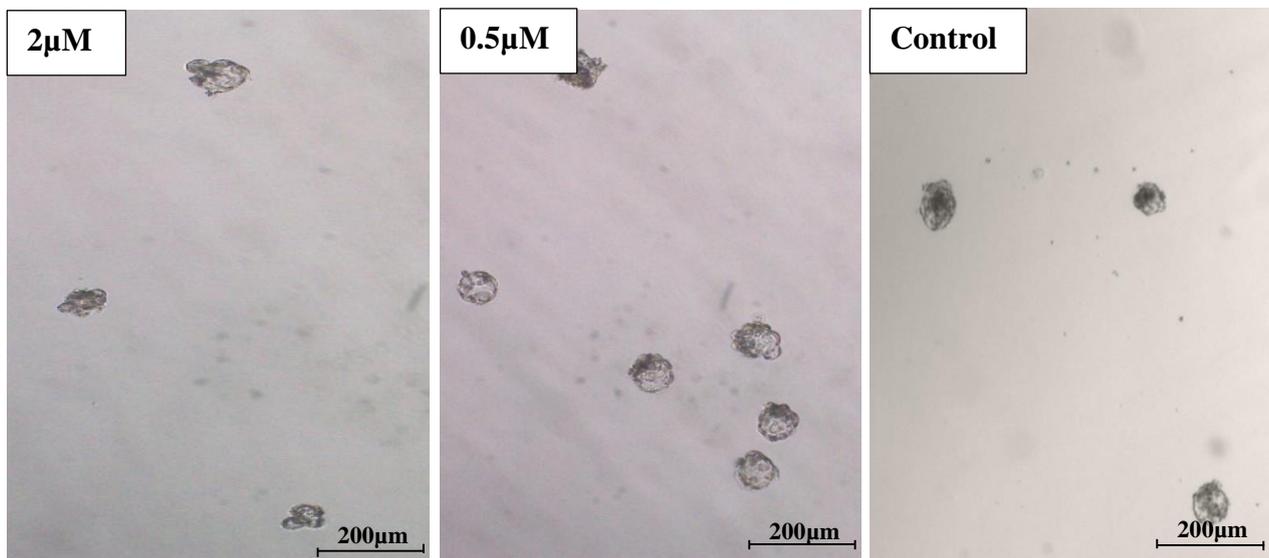


Figura 5: Blastocistos producidos post separación de blastomeras a los seis días de cultivo.

El número y porcentaje de blastocistos al sexto día de cultivo post separación de blastomeras no presentó diferencia al nivel de $P < 0.05$ (Tabla 2, Figura 5), sin embargo se nota una superioridad numérica al agregar 0.5 μ M respecto a los otros tratamientos.

Tabla 3. Cantidad de células totales y células vivas en blastocistos obtenidos post separación de blastomeras a los seis días de cultivo con dos concentraciones de resveratrol y un grupo control.

Embriones 6 día post separación de blastómeros			
Grupo	N° embriones	N° células totales (± E.E.M)	N° células vivas (± E.E.M)
2µM	37	87±0.6 ^b	84±0.2 ^b
0.5µM	45	96±1.0 ^a	93±0.3 ^a
Control	36	86±0.8 ^b	83±0.2 ^b

a, b; letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), ± error estándar de la media

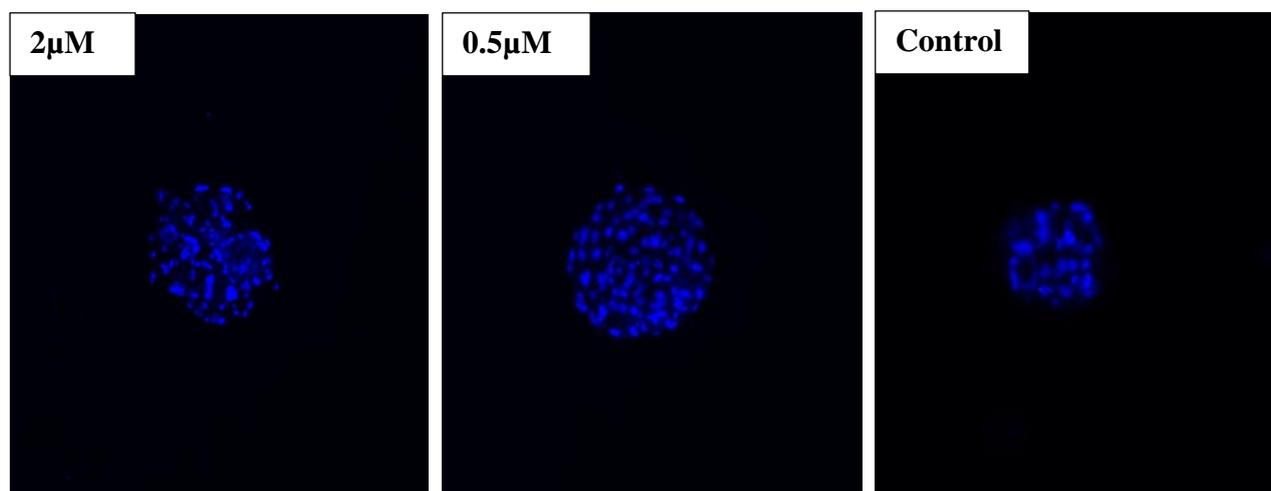


Figura 6: Determinación de células totales con tinción Hoechst en blastocistos.

La concentración de 0.5µM de resveratrol en el cultivo post separación de blastomeras supero ($p < 0.05$) en 9 y 8 células totales con respecto a 2µM y el grupo control. Así mismo presenta superioridad en número de células vivas la suplementación con 0.5µM de resveratrol respecto al 2µM y el control como se muestra en la Tabla 3.

IV. DISCUSIONES

Según Takeo et al. (2014) el uso de resveratrol en la fecundación ayuda a contrarrestar la poliespermia dando por consiguiente mejores resultados en clivaje y producción de embriones en bovinos, en la presente investigación se agregó las dosis de resveratrol posterior a las 18 horas de fecundación donde este ya no tuvo contacto con los espermatozoides sino directamente con los cigotos ya fecundados, por lo que en los resultados no hubo diferencia en clivaje por tratamientos y grupo control.

Galeati y Spinaci. (2015), reportan que la adición de resveratrol en los medios de cultivo para la producción de embriones *in vitro* tiene un efecto positivo en su calidad ya que disminuye los procesos de apoptosis. Lo cual es corroborado por Zullo (2015), quien determina que la suplementación con altas o bajas concentraciones de resveratrol no influye en las tasas de producción *in vitro* de blastocistos bovinos sin embargo respalda que las bajas concentraciones de su suplementación en los medios de cultivo mejora la calidad de los embriones bovinos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación donde no se observó diferencia significativa ($p < 0.5$) en la tasa de producción de blastocistos con el uso de resveratrol, lo que podría también haber estado influenciado por la manipulación en la separación de blastomeras aumentando el estrés oxidativo que resulta en altos niveles tóxicos de ROS perjudicando su desarrollo embrionario (Kitagawa, Suzuki, Yoneda Watanabe, 2004; Nasr-Esfahani, Aitken, Johnson, 1990), mientras que los resultados en calidad embrionaria fueron similares respecto al promedio del número de células totales (96.0) y el promedio de células vivas por embrión, lo que indica que la adición de resveratrol en el medio de cultivo a una concentración de 0.5 μM tiene efecto positivo en la calidad de los embriones producidos por separación de blastomeras,

La mejora en la calidad embrionaria respecto al número de células totales es corroborado por Lee et al. (2010) y Salzano et al. (2014), quienes realizaron estudios con resveratrol en la producción de embriones *in vitro* en cerdos y bovinos teniendo mejores resultados con la concentración de 0.5 μM , concordando con estos resultados, que usando la misma cantidad de resveratrol presento mejor calidad (Tabla 3, Figura 6). Giaretta et al. (2013) reportaron mejores resultados en el proceso de vitrificación de ovocitos porcinos con una concentración de 2 μM por lo que se tomó en consideración

esta concentración por ser también la separación de blastomeras un proceso que provoca estrés fuera del desarrollo normal de un embrión, sin embargo esta concentración de resveratrol no tuvo efecto positivo sobre el porcentaje y la calidad de blastocistos (Tabla 2, Tabla 3).

V. CONCLUSIÓN

- No se observó diferencia en el número de embriones clivados a los 3 días de cultivo con la suplementación de 2 μ M, 0.5 μ M de resveratrol y el grupo control.
- El número de embriones que alcanzo el estadio de 8 a 10 blastomeras fue mayor con la suplementación de 0.5 μ M resveratrol en el medio de SOF.
- No se observó diferencia en el número de blastocistos producidos post separación de blastomeras con la suplementación de 2 μ M, 0.5 μ M de resveratrol y el grupo control.
- La suplementación de 0.5 μ M resveratrol en el medio SOF mejoró significativamente la calidad de los embriones en número total de células.
- El número de células vivas por blastocisto fue mayor con la suplementación de 0.5 μ M resveratrol en el medio SOF.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abdel-Wahab, A., Zullo, G., Boccia, L., De Blasi, M., Longobardi, V., y Albero. (2012). Resveratrol during *in vitro* culture improves cryotolerance of *in vitro* produced bovine embryos. *Reproduction Fertility and Development*, 25(1), 213-4.

Baur, J.A., y Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: their vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 493–506.

Chang R. (1992). Reacciones químicas. En: Química 4ª ed. Mc Graw-Hill-Interamericana; 104-117.

Evan, G y Littlewood, T.A. (1998). Matter of life and cell death. *Science*. 281: 1317-22.

Galeati, G y Spinaci, M. (2015). Resveratrol from Red Grapes: An Useful Agent for Oocyte Maturation and Subsequent Embryonic Development. *Austin Journal in vitro fertilization*. 2(1): 1-3.

Gambini, J., López, R., Gonzáles, G., Inglés, M., Abdelazid, K., Alami, M., Costa, V., Borrás, C., y Viña, J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriátría y Gerontología*, 48(2), Pages 79-88.

Gaviria, S., Morado, B., Herrera, A., Betancur, G., Álvarez, R., Zuluaga, J., y Cética, P. (2018). Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of *in vitro*-produced bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 31(3) 521-528.

Giaretta, E., Spinaci, M., Bucci, D., Tamanini, C., y Galeati, G. (2013). Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev*. Article ID 920257. doi:10.1155/2013/920257

Huang, L., Shiao, N., Hsuuw, Y y Chan, W. (2007). Protective effects of resveratrol on ethanol-induced apoptosis in embryonic stem cells and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. *Toxicology*. 242:109–122.

Johnson, M y Nasr-Esfahani, M. (1994). Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*. *BioEssays*, 16(1), 31–38.

Jhonson, W., Loskutoff, N., Plante, Y y Betteridge, K.. (1995). Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an *in vitro* derived four cell embryo. *Veterinary Record*, 137(1), 15-16.

Kitagawa Y., Suzuki K., Yoneda A y Watanabe T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*. 62: 1186–97.

Kwak, S., Cheong, S., Jeon, Y., Lee, E y Choi, K.. (2012). The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 78(1), 86–101.

Lee K., Wang C., Chaille J.M y Machaty Z. (2010). Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 56 (3): 330–335.

Liebfried, L y First, N. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci*. 48:76-86.

Liu, Y., He, X., Huang, X., Ding, L., Xu, L., Shen, Y., Zhang, F., Zhu, M., Xu, B., Qi, Z y Wang, H. L. (2013). Resveratrol protects mouse oocytes from methylglyoxal-induced oxidative damage. *PLoS One*. 8 (10).

Nasr-Esfahani M., Aitken J y Johnson M. (1990). Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development*. 109: 501–507.

Parrish, J., Krogenaes, A y Susko-Parrish J. (1995). Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of *in vitro* fertilization and embryo development. *Theriogenology*. 44:859-870.

Pirola, L y Fröjdö, S. (2008). Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life*, 60(5), 323–332.

Pryor WA. (1994). Free radical and lipid peroxidation. *Academic Press*. 1-24

Roche, E y Romero, A. (1997). Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. I) Especies activas del oxígeno. En: Romero-Alvira D, Roche E. Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología. *ENE Ediciones*. 55-88.

Roche, E y Romero, A. (1997). Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. II) Alteraciones oxidativas en las macromoléculas biológicas. En: Romero-Alvira D, Roche E. Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología. *ENE Ediciones*. 91-104.

Salzano, A., Alberio, G., Zullo, G., Neglia, G., Abdel-Wahab, A., Bifulco, G., Zicarelli, L y Gasparri, B. (2014). Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Animal Reproduction Science*.

Sato, E., Matsuo, M y Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: Improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5' monophosphate. *J Anim Sci*. 68: 1182-1187.

SPSS Inc., released 2007. *SPSS for Windows*, Version 16.0. SPSS Inc., Chicago.

Takeo, S., Sato, D., Kimura, K., Monji, Y., Kuwayama, T., Kawahara-MIKI, R., y Iwata, H. (2014). Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *Journal of reproduction and development*. 60(2): 92-99.

Vajta, G., Peura, T., Holm, P., Páldi, A., Greve, T., Trounson, A y Callesen H. (2000). New method for culture of zona-included or zona free embryos: the well-of-the well (WOW)

system. *Mol Reprod Dev.* 55:256–264.

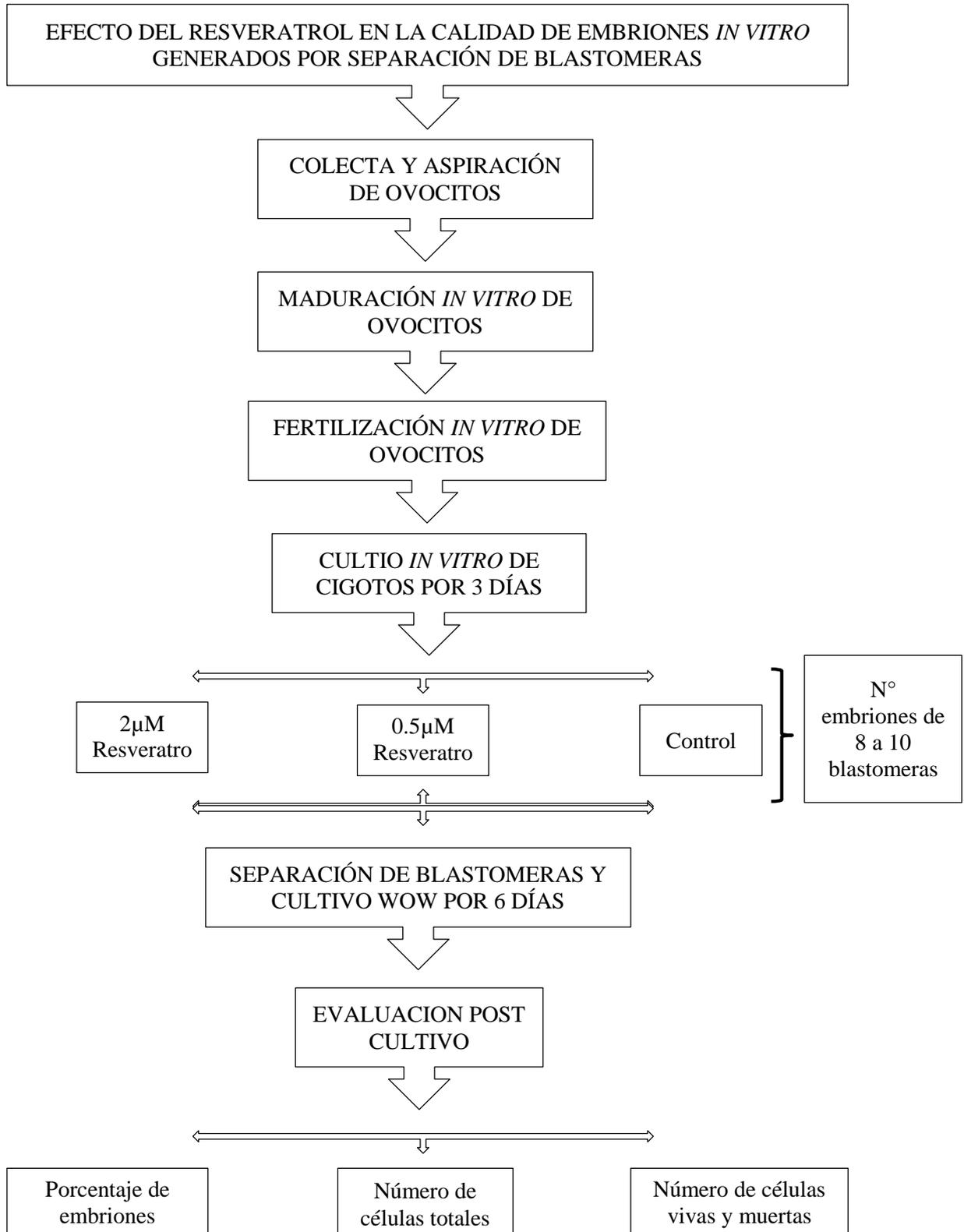
Veiga, E., Aguilar, J.A., Clavo, B y Llanes, L. (1997). Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos.* 22: 201-216.

Voet D. (1992). *Bioquímica.* Omega, Barcelona; 439-453.

Zullo G. (2015). Natural antioxidants during in vitro culture improve embryo quality in cattle: Tesis Doctoral, p.1-162.

VII. ANEXOS

ANEXO A: FLUJOGRAMA DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES POR SEPARACIÓN DE BLASTOMERAS CON DOS DOSIS DE RESVERATROL.



ANEXO B: PROTOCOLOS PARA LA PRODUCCIÓN EMBRIONES *IN VITRO*

TABLA 1: Preparación de la solución salina.

SOLUCIÓN SALINA 0.9% PARA 1L	
NaCl	9g
AGUA DESTILADA	1L
GENTAMICINA	1ml

* Luego de la preparación llevar a la autoclave para después agregarle el antibiótico.

TABLA 2: Preparación del medio de manipulación.

MEDIO DE MANIPULACIÓN PARA 100ml	
TCM-HEPES	90ml
SFB	10ml
GENTAMICINA	100ul

TABLA 3: Preparación del medio de maduración.

MEDIO DE MADURACIÓN PARA 10ml	
TCM-199	9ml
SFB	1ml
PIRUVATO	20ul
FSH-LH	50ul

GLUTAMINA	60ul
EGF	10ul
ESTRADIOL	10ul
GENTAMICINA	10ul

TABLA 4: Preparación del medio de fertilización

TALP - (FIV)FERTILIZACION			
	MW	mM	500ml
NaCl	58.44	114.0	3.331
KCl	74.55	3.2	0.119
CaCl₂ + 2H₂O	147.00	2.0	0.147
MgCl₂ + 6H₂O	203.30	0.5	0.051
NaHCO₃	84.01	25.0	1.05
NaH₂PO₄	119.98	0.3	0.018
LACTATO DE Na	112.10	10.0	0.93ml
ROJO FENOL	354.40	1.0mg/100ml	0.005

MEDIO DE FERTILIZACION PARA 10ml	
TALP-FIV	10ml
PIRUVATO	100ul
HEPARINA	100ul
GENTAMICINA	10ul
BSA-FAF	30mg

TABLA 5: Preparación del percoll al 90%

TALP – 10X (Medio utilizado para preparar gradiente de percoll)			
COMPONENTES	VOLUMEN/25	VOLUMEN/50ml	UI Stock desales
	ml (mg)	(mg)	
NaCl	6250ul	2.886gr	4M
KCl	57.75 mg	0.1155gr	1M
NaH₂PO₄	9 mg	0.018gr	0.1M
CaCl₂(2H₂O)	73.5 mg	0.147gr	1M
MgCl₂(6H₂O)	20. 25 mg	0.0405gr	0.1M
HEPES	595 mg	1.19gr	----

PERCOLL AL 90% PARA 40ml	
SP-TL 10X	4ml
NaHCO₃	84mg
LACTATO DE Na	90ul
PERCOLL	36ml
MgCl₂ 6H₂O	158ul
CaCl₂ H₂O	78ul

TABLA 6: Preparación del medio de capacitación.

TALP – SPERM – BASIC – MEDIA (Gabor)			
INGREDIENTES	1000ml	250ml	500ml
NaClg	5.772	1.443	2.886
KClg	0.231	0.05775	0.1155

NaH₂PO₄g	0.042	0.0105	0.021
CaCl₂ + 2H₂Og	0.294	0.0735	0.147
MgCl₂ + 6H₂Og	0.223	0.05575	0.1115
LACTATO DE Na	3.7	0.925	1.85
HEPES	2.603	0.65075	1.3015
NaHCO₃g	2.1	0.525	1.05
H₂Oml	998	249.5	499

MEDIO DE CAPACITACIÓN PARA 50ml	
TALP-SPERM	50ml
PIRUVATO	500ul
GENTAMICINA	50ul
BSA fracción V	300mg

TABLA 7: Preparación del medio SOF.

COMPONENTES	MW () DE W	200ml	250ml
NaCl	58.44	1258.2mg(100mM)	1572.75mg
KCl	74.55	106.8mg(7mM)	133.5mg
KH₂PO₄	136.1	32.4mg(1.2mM)	40.5mg
CaCl₂ + 2H₂O	147	49.6mg	62mg
MgCl₂ + 6H₂O	203.31	19.2mg	24mg
NaHCO₃	84.01	421.2mg	526.5mg
ROJO FENOL	.-	0.28mg	0.35mg
LACTATO DE Na	//1.3g/ml	94.12ul (60%)	117.65ul

*Filtrar y almacenar a 4°C hasta añadir aditivos (3 tubos de 50ml).

ADITIVOS SOF (medio de cultivo)			
	250ml	100ml	10ml
PIRUVATO	1ml	400ul	40ul
GLUTAMINA	500ul	200ul	20ul
AAE	5ml	2ml	200ul
AANE	2.5ml	1ml	100ul
EGF	250ul	100ul	10ul
AC. CITRICO	250ul	100ul	10ul
MYOINOSITOL	2.5ml	1ml	100ul
SFB	5ml	2ml	200ul
GENTAMICINA	250ul	100ul	10ul
BSA FAF	750mg	0.3g	0.03

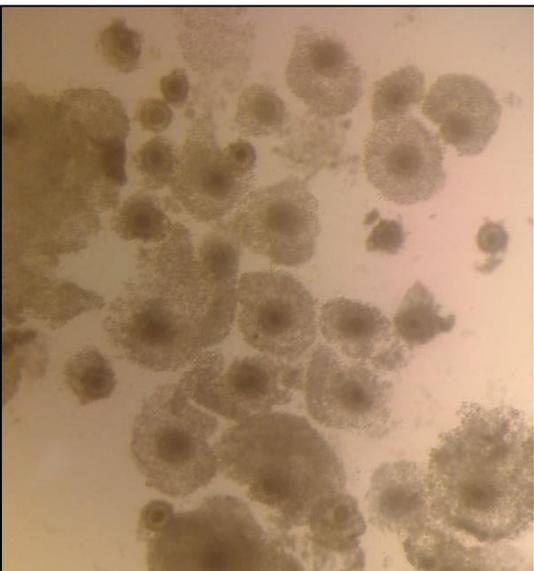
ANEXO C: FOTOS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO* POR SEPARACIÓN DE BLASTOMEROS.



Aspiración folicular de ovarios de ganado vacuno



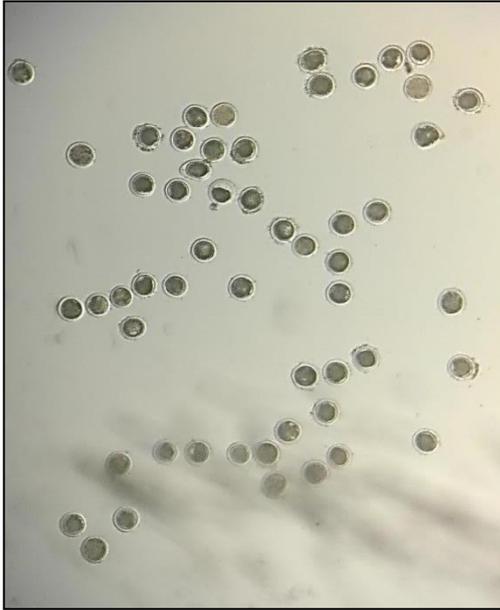
Ovocitos seleccionados para maduración de categoría A y B



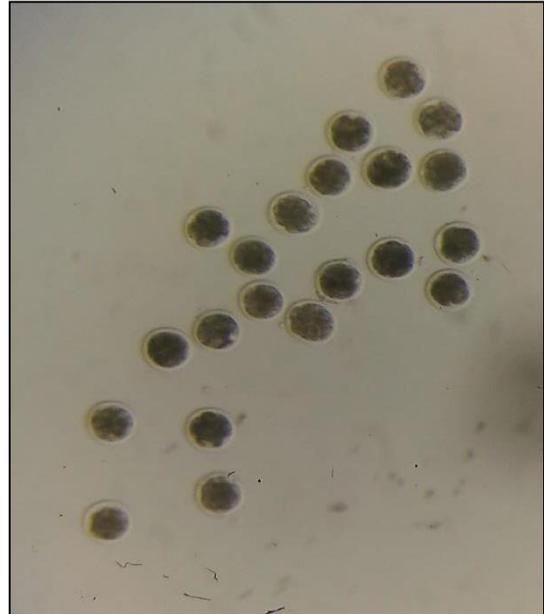
Ovocitos maduros de categorías A y B.



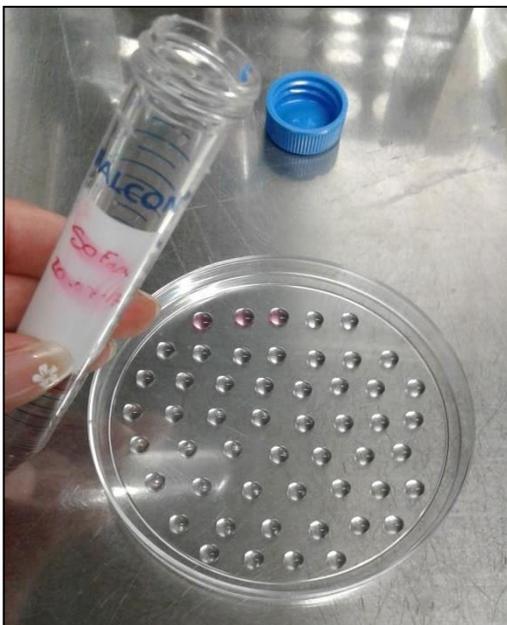
Ovocitos fecundados con semen de toro de la raza Brangus.



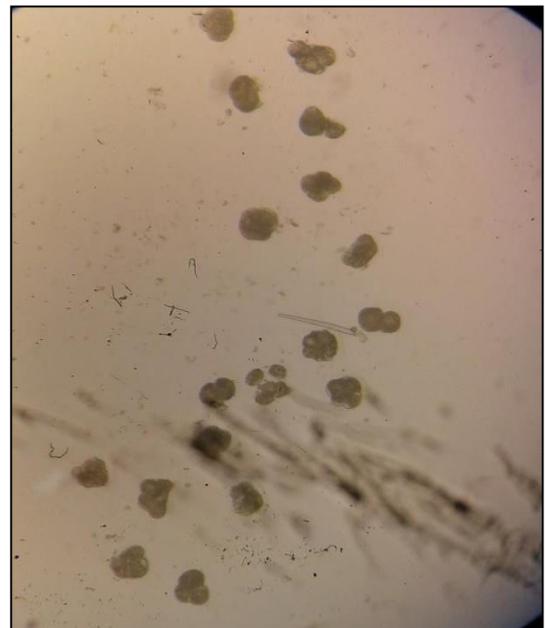
Cigotos a las 18 horas de fecundación



Embriones de 3 días con ocho a diez blastómeros



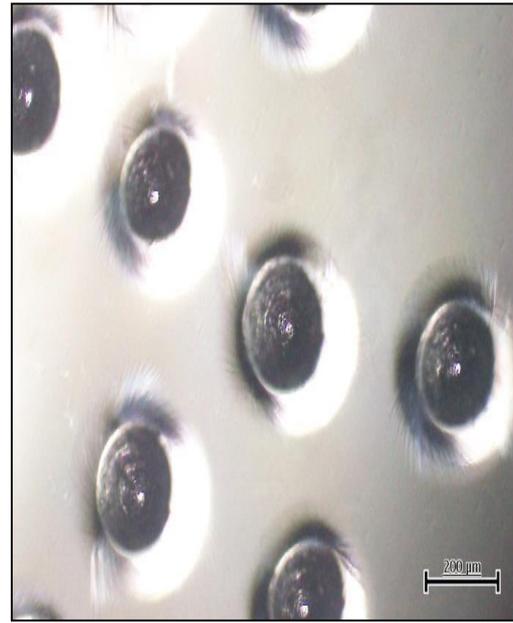
Preparación de medios con pronasa y SOF para sacar la zona pelúcida.



Embriones sin zona pelúcida.



Separación de blastómeros



Well of the well (WOW) pocillo hecho a mano para el cultivo de las blastómeros



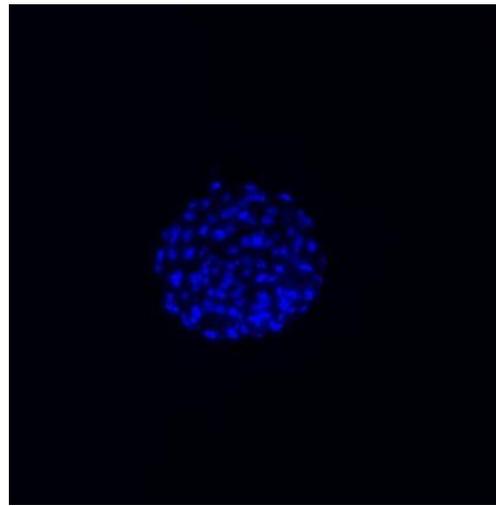
Embriones producidos post separación de blastómeros suplementado con resveratrol.



Tinción de embriones con yoduro de propidio (PI)



Tinción con fluoresceína diacetato
(FDA)



Tinción con Hoesch