

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO DIVISIÓN  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Suplementación con betacarotenos en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos  
de bovino como medio antioxidante**

**Prestador de Servicio Social:**

Zepeda Bazan Alan Huitzel.

Matricula: 2162033983

**Asesor Interno:**

Dr. Filiberto Fernández Reyes.

No. Económico: 17066

Firma 

**Asesor Externo:**

Lucio Santos Ventura

Firma   
Cedula profesional: 12135424

**Proyecto de asesor donde se participó**

Crioconservación de embriones de bovino producidos *in vitro*, mediante vitrificación usando etilen glicol y trehalosa

**Lugar de realización:**

Laboratorio. Manejo de la reproducción Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad.  
Xochimilco.

**Fecha de inicio y terminación:** 01/08/22 a 01/02/23

## 1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación tiene como objetivo desarrollar la maduración *in vitro* de ovocitos de bovino, utilizando TCM 199 como medio de cultivo adicionado con beta carotenoides, como una sustancia antioxidante, en cocultivo de células de la granulosa. Se ha reportado que dentro de los factores que afectan el desarrollo embrionario *in vitro* se encuentra el estrés oxidativo, que ha sido atenuado con la adición de sustancias antioxidantes a los medios tales como las Vitaminas A y E, que adicionadas a los medios de maduración y cultivo *in vitro* favorecieron el desarrollo embrionario según lo mostrado en un estudio realizado por García en 2013.

La producción *in vitro* de embriones (PIV), comprende varios procesos fundamentales: la maduración ovocitaria, la capacitación espermática, la fecundación *in vitro* y el desarrollo embrionario. Por lo tanto, durante los diferentes procesos de la PIV de embriones, el estrés oxidativo debe contrarrestarse mediante la adición de agentes antioxidantes a los medios de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* (CIV). Numerosos productos, biológicos o químicos con estas propiedades, se han agregado como suplemento para medios de PIV de las células de mamíferos, entre los que se encuentran proteínas, vitaminas, enzimas y minerales.

El estrés oxidativo causado por las especies reactivas del oxígeno (ROS) es producido como una consecuencia del metabolismo aeróbico fisiológico normal. La mayoría de los ROS se generan a nivel mitocondrial, como subproductos de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Pero un desbalance entre la producción de los ROS y el sistema de defensa antioxidante en los sistemas vivos ocasiona una ruptura de la función celular y daño. Los ROS son moduladores cruciales de las funciones celulares. A bajas concentraciones, son participantes esenciales en la señalización celular, la inducción de la respuesta mitogénica, la defensa contra agentes infecciosos, mientras que el exceso puede alterar la función celular normal y promover el daño irreversible a lípidos, ácidos nucleicos y a proteínas celulares (Carvajal, 2019).

A pesar de los avances en las técnicas de reproducción asistida para simular las condiciones *in vivo*, dos factores principales contribuyen a la generación y acumulación

de ROS *in vitro*: la ausencia de mecanismos de defensa endógenos y la exposición de los gametos y embriones a ambientes que generan ROS. Entre las fuentes exógenas se encuentran factores ambientales, como la criopreservación, la concentración de oxígeno, la fuente de energía, el medio de cultivo y la luz. Se ha reportado que la exposición a altas concentraciones de oxígeno, potencia el aumento de los niveles de ROS, 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 (Torres, 2019).

En la especie bovina, aproximadamente, el 90% de los ovocitos inmaduros de calidad óptima (tipos I y II) alcanzan la metafase II y expulsan el primer corpúsculo polar entre las 16 y 24 horas de comenzada la maduración *in vitro* (MIV).

Si bien, el suero fetal bovino (SFB) aporta; aminoácidos, vitaminas y minerales a los distintos medios de PIV de embriones y puede estimular y/o inhibir la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario, el SFB también presenta fluctuaciones en sus componentes, dependientes del animal donante y del lote de procedencia del suero. Por tal razón, el empleo de algunas sustancias antioxidantes en los medios de PIV de embriones ha evolucionado progresivamente hasta los momentos actuales y requiere de continuas investigaciones para su perfeccionamiento (García, 2013).

Se ha probado que la maduración de ovocitos mediante la elección *in vitro* es una manera fiable para la producción de un mayor número de embriones provenientes de animales de alto valor genético, a un costo menor que las prácticas convencionales de superovulación y producción de embriones (Wani, 2002). Aunado a esto, la manipulación de los ovocitos permite una evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de estos.

La maduración *in vitro*, es una técnica que está tomando auge en la actualidad para la producción de embriones, debido a que se han obtenido resultados satisfactorios y se han cubierto las necesidades y problemas existentes en cuanto a la producción pecuaria se refiere (Espin, 2018).

## **2.OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo general

Desarrollar la maduración *in vitro* de ovocitos de bovino en un medio enriquecido con betacarotenos como un antioxidante.

### 2.2 Objetivos Particulares

Valorar la viabilidad de los ovocitos madurados *in vitro* con betacarotenos como sustancia antioxidante.

Determinar la concentración óptima de betacaroteno en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos de bovino.

Valorar el estado de maduración de ovocitos de bovino después del cultivo *in vitro* con la presencia de betacarotenos.

## **3. METODOLOGÍA UTILIZADA**

Colecta y transporte de ovarios.

Los ovarios fueron colectados de hembras bovinas adultas sacrificadas en un rastro en la localidad de Temamatla y transportados al laboratorio en solución salina al 0,9 % adicionada con antibiótico-antimicótico (Penicilina G 10000 UI/mL, Estreptomicina 10000 UI/mL y Anfotericina 24 UI/mL) 1mL/L a una temperatura de 30-35 °C. Los medios de cultivo utilizados fueron preparados con reactivos de grado cultivo celular de Sigma Chemical Co (St, Louis, Mo, USA) y diluidos en agua ultrapura Milli-Q.

Los ovocitos se colectaron por aspiración de folículos de 2 a 7mm de diámetro en medio TL-Hepes-PVA a 38.5° C; posteriormente se realizó la colección de los COC's (Complejo cúmulo ovocito). Una vez colectados los COC's se introdujeron en cajas de cuatro pozos que contenían 500 µL de TCM suplementado con 10% de SFB cubiertos con aceite mineral y se cultivaron por 24 horas dentro de un ambiente 5% de CO<sub>2</sub>, 38.5 °C y 90% de humedad. Según el protocolo descrito por Soto (2019).

Los ovocitos incubados fueron divididos en 4 grupos:

El grupo control que no fue suplementado con betacarotenos.

El grupo 1 con concentración baja de suplementación de betacarotenos 10  $\mu\text{L}$ .

El grupo 2 con concentración media de suplementación de betacarotenos 20  $\mu\text{L}$ .

El grupo 3 con concentración alta de suplementación de betacarotenos 30  $\mu\text{L}$ .

Los 3 grupos suplementados con betacarotenos fueron comparados con el grupo control para determinar cuál fue la concentración óptima que favoreció la maduración ovocitaria.

Evaluación de ovocitos

24 horas después de la incubación se evaluó el crecimiento celular del cumulo-ovocito.

Se removieron las células para limpiar el ovocito en gotas de 100  $\mu\text{L}$ . de medio TL-Hepes. Hasta dejarlo desnudo y se procedió a colocar los ovocitos en fijador 24 horas. Posteriormente se les colocó una tinción de ácido nucleico fluorescente azul que se une al ADN (DAPI), para observar al microscopio el desarrollo y maduración del ovocito.

#### **4. ACTIVIDADES REALIZADAS**

Preparación de medios:

- 1- Suplementación del medio de maduración TCM-199 para los ovocitos. 10 ml.
- 2- Se extraen 2.5 ml extra del mismo medio para ser suplementados con cisteína.
- 3- Se retiran 0.5 ml de los 10 ml de medio suplementado TCM-199 y se agrega la misma cantidad del medio que fue suplementado con cisteína.
- 4- Se agregan 100  $\mu\text{L}$  de hormona comercial Factor de crecimiento epidermal (FCE).
- 5- Se acondicionaron cajas de 4 pozos de 500  $\mu\text{L}$  de TCM-199 suplementado para la maduración y se agrega 245  $\mu\text{L}$  de aceite mineral sobre el medio, como método de protección para los ovocitos.
- 6- Se preparo una caja de Petri para el lavado de los ovocitos después de su extracción del ovario, con 4 gotas de 100  $\mu\text{L}$  cada una y cubrió con aceite mineral completamente.

7- Suplementación del medio TL-Hepes. En un tubo de 15 mL se colocaron, 14 mL de TL-Hepes y se agregaron 450  $\mu$ L de Heparina.

8- Las cajas de medios son puestas en la incubadora, hasta su uso en el lavado e incubación y maduración de los ovocitos recolectados.

9- Lavado del instrumental utilizado para la elaboración de medios.

Recuperación de ovocitos de bovino.

1. Recuperación de ovarios en la línea de faenado y su limpieza del tejido adiposo presente.

2- Transporte de los ovarios obtenidos en un medio de solución salina con antibiótico para su conservación durante el viaje.

3- Lavado de los ovarios con solución salina y antibiótico.

4- Punción de los folículos para la obtención de los ovocitos.

5- Lavado del complejo cumulo ovocito con medio TL-Hepes-PVA.

6- Selección de los ovocitos y formación de los grupos para los tratamientos descritos en la metodología para su posterior maduración en medio TCM-199 suplementado.

7- Periodo de incubación 24 horas.

Lavado y Tinción de ovocitos.

1- Evaluación de la maduración de los ovocitos, después de las 24 horas de incubación.

2- Lavado de los ovocitos para separar de las células de cúmulos adheridas a ellos.

3- Fijación de los ovocitos para su posterior tinción y evaluación en el microscopio de fluorescencia.

4- Tinción de los ovocitos con DAPI

Evaluación de la maduración de Ovocitos

1- Los ovocitos fueron evaluados y comparados por grupo, después de aplicarles la tinción se observó el estado de desarrollo respecto a su maduración a través de la presencia de Vesícula Germinal, Metafase I o Metafase II.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados a través de una prueba de Chi Cuadrada para estimar las diferencias estadísticas significativas a un intervalo de confianza de  $p < 0.05$ , entre todos los grupos con respecto a la presencia de cromatina (Daniel, 1982).

Otra prueba estadística fue la de Proporciones de los ovocitos que lograron la Metafase II.

## 5. METAS ALCANZADAS

Se realizaron 15 experimentos y se evaluó la maduración *in vitro* de 168 ovocitos.

Se determinó el estado de la cromatina de los 168 ovocitos después del cultivo para su maduración *in vitro*.

La evaluación fue contrastada entre los grupos y se obtuvo un mayor porcentaje de maduración en el grupo suplementado con 10  $\mu\text{L}$  de betacarotenos.

## 6. RESULTADOS

Los resultados de la maduración de 168 ovocitos de bovino, después de 24 horas de incubación *in vitro*, se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Estado de la cromatina en los ovocitos madurados *in vitro* después de 24 horas de cultivo, clasificados por tratamiento.

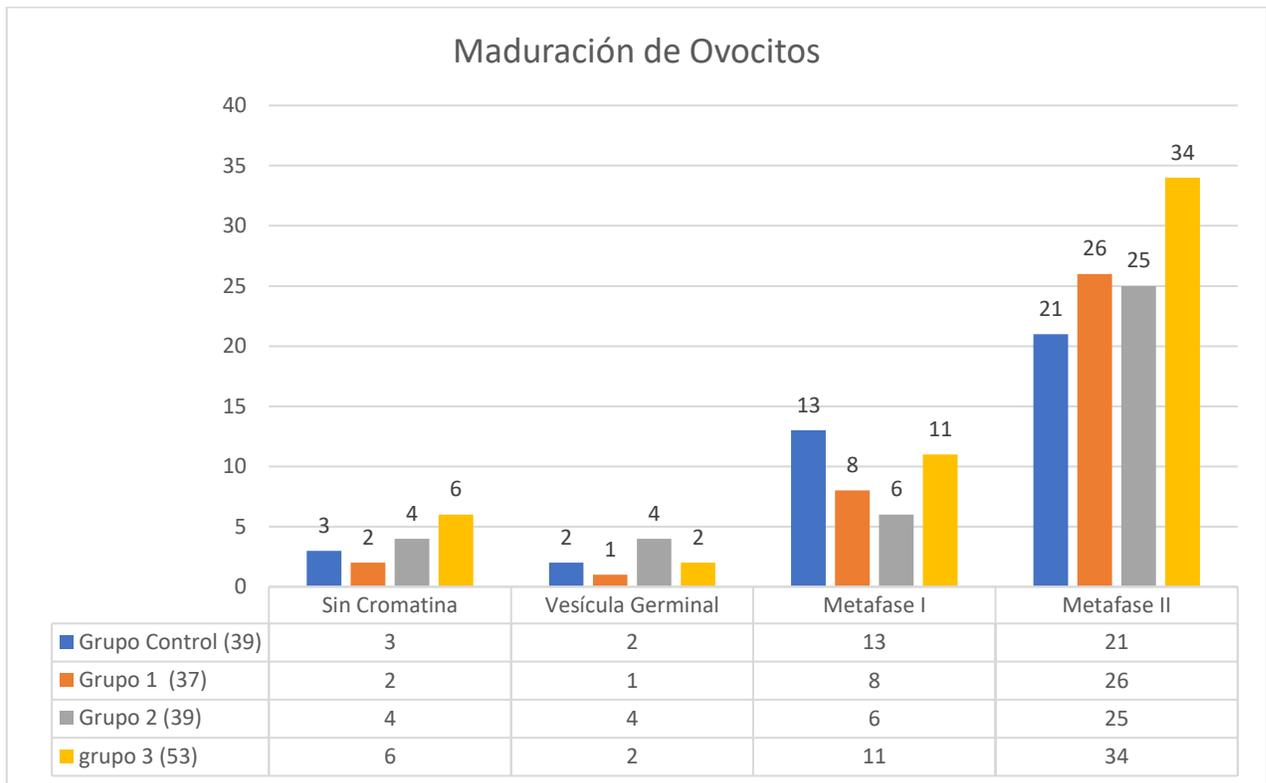
Grupos	Sin Cromatina	Vesícula Germinal	Metafase I	Metafase II	Porcentaje por Grupo
Grupo Control	3 (7.6%)	2 (5.1%)	13 (33.3%)	21 (53.8%) <sup>ab</sup>	39 (23.2%)
Grupo 1	<b>2 (5.4%)</b>	<b>1 (2.7%)</b>	8 (21.6%)	<b>26 (70.2%)<sup>ac</sup></b>	37 (22.0%)
Grupo 2	4 (10.2%)	4 (10.2%)	6 (15.3%)	25 (64.1%) <sup>a</sup>	39 (23.2%)
Grupo 3	6 (11.3%)	2 (3.77%)	11 (20.7%)	34 (64.1%) <sup>a</sup>	53 (31.5%)
Total Ovocitos	<b>15 (8.9%)</b>	<b>9 (5.3%)</b>	<b>38 (22.6%)</b>	<b>106 (63.0%)</b>	<b>168 (100%)</b>

Literales iguales indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). La probabilidad de tener un porcentaje mayor en el Grupo 1, comparado con el control es de (.5).

Los resultados de la maduración *in vitro* indican que más de la mitad de los ovocitos cultivados alcanzan el estadio de MII, lo que corresponde al 63.0% del total de ovocitos evaluados, sin observar ninguna diferencia significativa ( $p>0.05$ ), entre grupos. El Grupo 1, obtuvo el mayor porcentaje de MII, la cual fue de 70.2%, teniendo una probabilidad mayor que el grupo control de 0.5, asimismo en el grupo 1, fue menor el porcentaje de evaluados sin cromatina y vesícula germinal. Por otra parte el Grupo 3, tuvo un mayor número de ovocitos madurados debido al mayor número de ovocitos evaluados en este grupo, sin tener un efecto significativo ( $p>0.05$ ) en la maduración.

La gráfica 1. Muestra el valor numérico de maduración por grupos de acuerdo con el estadio que se determinó en la evaluación.

Grafica 1. Muestra numérica de maduración de ovocitos por grupo y su estado.



La gráfica muestra el número de ovocitos evaluados al microscopio y la determinación de su fase de maduración. Asimismo, se observa que en todos los grupos predominó el estadio de MII y sobresale el grupo 3, debido al mayor número de ovocitos evaluados en

este grupo, sin tener un efecto significativo ( $p > 0.05$ ) en la maduración total, que fue de 63.0%.

## 7. DISCUSIÓN

La capacidad de desarrollo de un ovocito ha sido definida por Aponte (2010), como la capacidad de reiniciar y completar la meiosis, de dirigir la fecundación y de iniciar los eventos que resultan en el desarrollo embrionario. Durante la maduración *in vitro* son muchos los factores que pudieran estar afectando la capacidad de desarrollo de los ovocitos de bovino. Cualquier mejora que se haga en esta etapa incrementará el éxito en las fases subsiguientes.

Se han reportado porcentajes variables de maduración, utilizando diferentes técnicas de manejo de los ovocitos, las tasas de maduración oscilan entre un 50% y un 80%, al respecto Martino y col. (2009), obtuvieron un porcentaje de maduración de 56.9% por medio de la técnica de slicing. Hurtt y col. (2010), obtuvieron un porcentaje de 77% y Luna y col, (2001), obtuvieron una tasa de 80.3%.

Un estudio que involucro los  $\beta$ -carotenos, como un inhibidor muy eficaz de las ROS, reporta que tienen una contribución beneficiosa al desarrollo ovárico y la esteroidogénesis, aunque también menciona que aún se desconoce en gran medida el efecto del  $\beta$ -caroteno en el desarrollo de los ovocitos, especialmente en la maduración de los ovocitos. Los resultados de este trabajo mostraron que los mecanismos subyacentes de la suplementación con  $\beta$ -caroteno no solo reduce la formación de ROS y la apoptosis celular, sino que también puede restaurar la expresión de actina, la formación del dominio libre de gránulos corticales (CGFD), la distribución homogénea de las mitocondrias y la maduración nuclear. Los datos sugieren que el  $\beta$ -caroteno actúa como un antioxidante potencial en el ovocito. Por lo tanto, los hallazgos de esta investigación proporcionan el conocimiento fundamental para usar el  $\beta$ -caroteno como antioxidante para mejorar la calidad del ovocito e incluso la función ovárica. Yu (2019)

Otro estudio realizado por Jaramillo en 2019, en el que probó la L-Carnitina (L-C) como un compuesto antioxidante, suplementado en el medio de maduración de los ovocitos, reportando que la suplementación con L-C reduce los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs), durante la maduración *in vitro* de ovocitos de ovinos (Mishra *et al.*, 2016a), bovinos (Takahashi *et al.*, 2013) y porcinos (Wu *et al.*, 2011, You *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha encontrado este efecto antioxidante sobre los niveles de EROs en embriones bovinos en el estadio de dos células, mas no así en etapas posteriores del desarrollo embrionario.

Lo que sugiere una concordancia con la maduración obtenida en el presente trabajo, en el grupo 1, al que se le suministro menor cantidad de betacarotenos como medio antioxidante para el ovocito.

Se puede observar en la gráfica 1, que el estadio de metafase II es dominante en todos los grupos, lo que podría sugerir un buen manejo desde la obtención de los ovarios, hasta su evaluación. Como se menciona en otros trabajos que involucran la recolección de ovocitos. Los métodos usados para la colección y la maduración de los ovocitos tales como la punción o aspiración con jeringa, corte de folículos y perfusión de oviducto, cada una de estas formas de extracción presenta ventajas y desventajas que afectan la inducción de la meiosis, así como el potencial de desarrollo de los ovocitos. Fernández (2010).

Con relación al grupo control, el grupo 3 presenta la mayor cantidad de ovocitos en metafase II, debido a que del total de ovocitos cultivados en este grupo representó el 31.5%, en tanto que al grupo 1, correspondió el 22.0%. Sin embargo, dentro del grupo 1, se obtuvo el 70.2% de maduración con la suplementación de 10  $\mu$ L de betacarotenos, lo que sugiere que pequeñas cantidades en el medio de maduración pueden tener un efecto antioxidante y muestra una capacidad de mejoría y adaptación de los ovocitos para el desarrollo de la maduración. Esto debido a que en condiciones fisiológicas normales los EROs y los antioxidantes celulares se encuentran en equilibrio. Las células poseen mecanismos fisiológicos para obstaculizar la formación excesiva de radicales libres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>.</sup>, etc.), incluidas las enzimas específicas que controlan los niveles intracelulares. Los captadores de oxígeno presentes en fluidos foliculares y oviductales

protegen el estrés oxidativo de ovocitos y los embriones *in vivo*, eliminando o reduciendo el efecto de EROs, además de varias enzimas, tales como Cu-Zn superóxido dismutasa (Cu-Zn/SOD), Mn/SOD, catalasas, glutatión-peroxidasa (GSH-Px) y ceruloplasmina, además de las vitaminas A, C y E. Sin embargo, en condiciones *in vitro* los niveles de antioxidantes son más bajos que *in vivo*, porque los ovocitos y embriones no se benefician del sistema de protección antioxidante materna. Las especies reactivas de oxígeno pueden atravesar fácilmente las membranas celulares, alterando la mayoría de las moléculas orgánicas y afectando el desarrollo temprano de los embriones (Ortega, 2022).

Los betacarotenos son un precursor de la vitamina A que es un antioxidante del que se ha reportado su eficacia en el tratamiento de la maduración de los ovocitos, En su estudio, García describe que la suplementación de los medios de MIV de ovocitos bovinos con diferentes concentraciones de vitamina A, con bajas concentraciones no afectó el desarrollo embrionario; en cambio, con niveles de 5  $\mu\text{M}$  de vitamina A incrementó el porcentaje de blastocistos ( $P < 0.001$ ), lo que sugiere un efecto antioxidante de la misma.

Sin embargo, otros autores no reportan resultados positivos con la adición de antioxidantes, como reporta Hernández (2010), la suplementación con L-cisteína como medio antioxidante y las concentraciones utilizadas bajo las condiciones de MIV aplicadas en su estudio no ejercieron un efecto positivo sobre el porcentaje de ovocitos bovinos que alcanzaron el estado de metafase II.

Por su parte Ali (2003), menciona que la suplementación con cisteína durante MIV mejoró la tasa de desarrollo del embrión bovino a la mórula y al blastocisto. Sin embargo, el desarrollo de embriones hasta las etapas de mórula y blastocisto no mejoró con los suplementos de antioxidantes enzimáticos como la catalasa.

## **8. CONCLUSIONES.**

En este trabajo se desarrolló la maduración *in vitro* de ovocitos en un medio enriquecido con betacarotenos como un antioxidante. Se logró madurar y evaluar los ovocitos a través de la metodología descrita y se pudo clasificar su estadio de maduración a través del microscopio.

Los resultados obtenidos indican que la concentración de 10  $\mu\text{L}$  de betacarotenos como antioxidante fue la óptima para alcanzar un mayor éxito de maduración de los ovocitos, además de la ejecución correcta del tratamiento de los ovocitos desde su obtención hasta su evaluación.

## **9. RECOMENDACIONES**

El desarrollo y aprendizaje de la técnica para obtener de ovocitos del ovario por medio de la punción es vital para recolectar los ovocitos sin dañarlos o perderlos en el proceso. Por lo cual el dominio de esto influye en la cantidad de ovocitos que se pueden recuperar por muestra por lo que se recomienda practicarla.

Como menciona, Salgado (2020), la maduración de ovocitos para desarrollo y producción de embriones *in vitro* es un proceso multifactorial en donde además de existir diversas técnicas para cada paso, la elección de cada una de estas deberá ser cautelosa y basada en resultados previos y condiciones de trabajo, ya que de esta decisión y aplicación dependerá el éxito o el fracaso del experimento.

Con la diferencia de resultados expuestos por diferentes autores de la eficacia y uso de antioxidantes en el medio de maduración, dispone a seguir investigando la adición de estos en futuros proyectos de maduración *in vitro* para proteger a los ovocitos durante la fase de maduración.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ali, A. A., Bilodeau, J. F., & Sirard, M. A. (2003). *Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development*. *Theriogenology*, 59(3-4), 939–949. Disponible en: [10.1016/s0093-691x\(02\)01125-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01125-1)
2. Aponte Julio A. Landínez, Patricia C. Villamediana , Hugo J. Hernández Fonseca \* y Eleazar Soto. (2010). Effect of Time of in vitro Maturation of Bovine Oocytes on the Meiotic Progression. Technical Note. \_\_Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XX, N° 6, 659 - 664, 2010. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95916206013.pdf>
3. Carvajal Carvajal, Carlos. (2019). Reactive oxygen species: training, function and oxidative stress *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100. Retrieved August 22, 2024, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es).
4. Daniel, W.W. Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. Limusa. México, D.F. 1982.
5. Espin, P. (2018). Maduración de ovocitos con dos medios de maduración diferentes (licenciatura). Universidad Politécnica Saleciana. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>.
6. Fernández Reyes, F, Hernández Pichardo, J. E and Reyes Flores, María del Carmen Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de. *Rev Salud Anim.*, Ago 2010, vol.32, no.2, p.78-83. ISSN 0253-570X
7. García-Díaz, J. R., Romero-Aguirre Gómez Corta, J., & Astiz Blanco, S. (2013). Adición de sustancias antioxidantes en los medios de cultivo empleados en la producción in vitro de embriones en mamíferos. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v35n1/rsa02113.pdf>. Recuperado 29 de junio de 2022, de <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v35n1/rsa02113.pdf>
8. Hernández - Fernández, Adirno y Hernández-Fonseca, Hugo. Efecto de la suplementación con L-cisteína en la maduración in vitro de ovocitos bovinos. *Rev. cient. (Maracaibo)* [online]. 2010, vol.20, n.3 [citado 2023-05-06], pp.268-273. Disponible en: <[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592010000300008&lng=es&nrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300008&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0798-2259.

9. Hurtt, A.; Landim, F.; Seidel, G.; Squieres, E. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenol.* 54: 119-128. 2000.
10. Jaramillo Bolivar, Natalia; Arzuaga Cedeno, Juan Miguel; Giraldo, John Jairo y Vasquez Araque, Neil A. Parámetros metabólicos, antioxidantes y competencia para el desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados in vitro con L-Carnitina. *Rev. investig. vet. Perú* [online]. 2019, vol.30, n.1 [citado 2023-04-27], pp.265-275. Disponible en: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172019000100027&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172019000100027&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1609-9117. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15703>
11. Luna, H.S.; Ferrari, I.; Rumpf R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Anim Reprod Sci.* 68:23-28. 2001.
12. Martino, A.; Mogas, T.; Palomo, M.J.; Paramio, M.T. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenol.* 41: 969-980. 1994.
13. Mishra A, Reddy IJ, Gupta PS, Mondal S. 2016a. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim.* doi: 10.1111/rda.12682.
14. Ortega Rojas, Ruth, Palma, Gustavo, Vacacela Ajila, Wilmer, & Carrera Durazno, Rubén. (2022). La cisteamina y sus aplicaciones en la producción in vitro de embriones. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(1), e20134. Epub 01 de enero de 2022. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v33i1.20134>
15. Salgado-Cruz, Erika, & Lopera-Vásquez, Ricaurte. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3), e17138. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17138>
16. Soto-Martínez, Yury Grisel, Casas-Hernández, Eduardo, Betancourt-Rule, José Miguel, & Fernández-Reyes, Filiberto. (2019). Desarrollo embrionario de bovino in vitro cocultivado con células oviductales y del cumulus oophorus. *Revista de Salud Animal*, 41(1), e01. Epub 01 de abril de 2019. Recuperado en 17 de julio de 2022,

de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2019000100004&lng=es&tlng=](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2019000100004&lng=es&tlng=)

17. Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N. 2013. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fert Develop* 25: 589-599. doi: 10.1071/RD11262
18. Torres-Osorio Viviana, Urrego Rodrigo, Echeverri-Zuluaga José Julián, López-Herrera Albeiro. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. Revisión. *Rev. mex. de cienc. pecuarias* [revista en la Internet]. 2019 Jun [citado 2024 Ago 23] ; 10( 2 ): 433-459. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242019000200433&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242019000200433&lng=es). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>.
19. Wani (2002) NA. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Res.*;44:89- 95.
20. Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, Zhu SE. 2011. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology* 76: 785-793. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.04.011
21. Yu, S., Zhao, Y., Feng, Y. *et al.*  $\beta$ -carotene improves oocyte development and maturation under oxidative stress in vitro. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* **55**, 548–558 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11626-019-00373-0>
22. You J, Lee J, Hyun SH, Lee E. 2012. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* 78: 235-243. doi: 10.1016/ j.theriogenology.2012.02.027

