



Producción de embriones *in vitro* sin antioxidantes para alcanzar un 40% de blastocistos viables.

Susana Alejandra, Anchico Coloma

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología


Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en

Biotecnología

Carrera Garcés Fredy Patricio Ph. D.

21 de febrero de 2023

Reporte de verificación de contenido



CERTIFICADO DE ANÁLISIS
mogster

TESIS Susana Anchico.docx

3% Similitudes

0% Texto entre comillas
0% similitudes entre comillas

6% Idioma no reconocido

Nombre del documento: TESIS Susana Anchico.docx.pdf ID del documento: acd0824183e9786310786ab6c5ea1b391f0d60e2 Tamaño del documento original: 960,74 ko	Depositante: MILTON VINICIO UDAY PATIÑO Fecha de depósito: 21/2/2023 Tipo de carga: interface fecha de fin de análisis: 21/2/2023	Número de palabras: 6798 Número de caracteres: 44.034
---	--	--

Ubicación de las similitudes en el documento:



Fuentes principales detectadas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	www.scielo.cl https://www.scielo.cl/pdf/infotec/v25n2/art16.pdf	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (40 palabras)
2	repository.ces.edu.co La influencia de la edad materna en los ovocitos bovinos y s... https://repository.ces.edu.co/handle/10946/5130	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (21 palabras)

Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	dspace.ucuenca.edu.ec implementación de un protocolo de maduración in vitro de... http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/9214/4/Trabajo de Titulacion.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (28 palabras)
2	www.scielo.org.pe Efecto de dos medios de fertilización en el desarrollo in vitro de... http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-911720021000500018	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (17 palabras)
3	www.zamorano.edu La Fertilización in vitro (FIV) en bovinos: Una Biotecnología Rep... https://www.zamorano.edu/2019/03/13/a-fertilizacion-in-vitro-fv-en-bovinos-una	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (15 palabras)
4	reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx 2.3 Aparato reproductor de la h... https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo2/aparato-reproductor-de-la-h...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (12 palabras)
5	www.redalyc.org https://www.redalyc.org/pdf/3731/373139068005.pdf	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (10 palabras)

Fuentes mencionadas (sin similitudes detectadas) Estas fuentes han sido citadas en el documento sin encontrar similitudes.

- 1 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07005961?ia=ihub>
- 2 <https://portalacademico.cch.unam.mx/biologia1/gametogenesis/ovogenesis>
- 3 <https://es.scribd.com/document/187816035/APARATO-REPRODUCTOR-BOVINO>
- 4 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285691>
- 5 http://www.avpa.uia.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_41.pdf



Firmado digitalmente por:
**FREDY PATRICIO
CARRERA GARCÉS**

Carrera Garcés Fredy Patricio Ph. D.

Director del Trabajo de Integración Curricular



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificado de director

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Producción de embriones in vitro sin antioxidantes para alcanzar un 40% de blastocistos viables”** fue realizado por la señorita **Anchico Coloma Susana Alejandra**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 21 de febrero del 2023

Firma:



.....
Carrera Garcés Freddy Patricio

C.C. 0602031569



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Anchico Coloma Susana Alejandra**, con cédula de ciudadanía n° 2300312846, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Producción de embriones in vitro sin antioxidantes para alcanzar un 40% de blastocistos viables”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 21 de febrero del 2023

Firma:

.....
Anchico Coloma Susana Alejandra

C.C. 2300312846



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo Anchico Coloma Susana Alejandra, con cédula de ciudadanía n° 2300312846, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: Título: **“Producción de embriones in vitro sin antioxidantes para alcanzar un 40% de blastocistos viables”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 21 de febrero del 2023

Firma:

.....
Anchico Coloma Susana Alejandra

C.C. 2300312846

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mi mamá Susana por su apoyo incondicional, a mi esposo Sergio por apoyarme día a día y siempre incentivarme para continuar y no darme por vencida, a mis hijos Adhara y Sebastián por ser mi mayor motivo de superación.

A mis hermanos José (+) y Gabriela por su apoyo en las diferentes etapas durante la universidad.

A Kassandra y Elyan por ser mis compañeros y amigos incondicionales que estuvieron a lo largo de mi carrera apoyándome.

Agradecimiento

Primero agradezco a dios por darme la sabiduría para culminar mis estudios. A mi mamá y hermana por brindarme su apoyo incondicional, gracias a ella y a su cariño que me impulso siempre para cumplir con mis metas y no abandonarlas pese a las dificultades.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas por darme la oportunidad de cursar mis estudios y contribuir con mi formación académica.

A mi director de tesis Dr. Fredy Carrera por su paciencia, dedicación y por su guía, sin sus palabras y consejos oportunos no hubiese podido completar con éxito mi trabajo de titulación.

A mis docentes parte importante de mi formación académica y personal, ellos fueron una parte fundamental para lograr culminar mi carrera.

A mis compañeros Kassandra, Elyan y Hadassa les agradezco por todos y cada uno de los momentos compartidos.

Índice

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificado de director	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice	8
Índice de Figuras	11
Índice de tablas	12
Resumen	13
Abstract	14
Capítulo I	15
Introducción	15
Planteamiento del problema	17
Justificación	18
Objetivos	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
Capítulo II	20

Marco Teórico.....	20
Aparato reproductor de la hembra.....	20
Aspiración folicular	23
Células del cúmulus.....	23
Maduración de oocitos.....	24
Fertilización de oocitos	24
Ovogénesis	24
Desarrollo embrionario.....	26
Capítulo III.....	28
Ubicación del área de investigación	28
Ubicación Política.....	28
Ubicación Ecológica.....	28
Materiales	29
Insumos	29
Equipos	30
Reactivos.....	30
Biológicos	31
Metodología	31
Solución de lavado.....	31
Solución Dulbeco	31
Solución de aspiración de oocitos	31

	10
Medio SP-Talp	32
Medio de Fecundación FERT- Talp.....	32
Procesamiento del semen	33
Fertilización	33
Preparación de solución Soft	33
Denudado de embriones	34
Diseño experimental.....	34
Capítulo IV.....	35
Resultados y Discusión.....	35
Maduración de ovocitos	36
Maduración de cigotos y blastocisto	39
Capítulo V	43
Conclusiones.....	43
CAPÍTULO VI	44
Recomendaciones.....	44
Capítulo VII.....	45
Bibliografía	45

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Fisiología del aparato reproductor bovino</i>	20
Figura 2. <i>Estructura del ovocito</i>	22
Figura 3. <i>Células del cúmulus de ovocito bovino</i>	23
Figura 4. <i>Ovogénesis</i>	26
Figura 5. <i>Cronología de desarrollo embrionario bovino in vitro</i>	27
Figura 6. <i>Ubicación geográfica</i>	29
Figura 7. <i>Influencia del medio de maduración TCM 1X - 10X</i>	38
Figura 8. <i>Desarrollo de ovocito hasta formar blastocisto</i>	39

Índice de tablas

Tabla 1. Cantidad de ovocitos recolectados	35
Tabla 2. Resultados ANOVA de ovocitos madurados	36
Tabla 3. Resultados ANOVA para ovocitos madurados seleccionados	37
Tabla 4. Resultados prueba de Tukey de ovocitos madurados	37
Tabla 5. Resultados prueba de Tukey de número de réplicas de ovocitos madurados	38
Tabla 6. Resultados de ANOVA para cigotos denudados	40
Tabla 7. Resultados prueba de Tukey de cigotos denudados (medio TCM)	40
Tabla 8. Resultados prueba de Tukey de cigotos denudados (réplica)	40
Tabla 9. Cigotos madurados y blastocistos	41

Resumen

La producción *in vitro* de embriones permite la optimización de los procesos de la producción y reproducción del ganado bovino favoreciendo de tal manera el mejoramiento genético del ganado bovino y por tanto obtener mayores beneficios de producción y salud en las crías resultantes. Además, esta técnica de producción de embriones permite la preservación de animales que están por extinguirse sus características genéticas. La producción *in vitro* de embriones consta de tres etapas: maduración de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros y finalmente el cultivo *in vitro* de cigotos a blastocistos, por eso el objetivo de esta investigación fue la producción de embriones *in vitro* empleando un tratamiento sin antioxidantes para la obtención de 40% de blastocistos viables. Para la maduración de ovocitos se empleó el medio TCM 199 en concentraciones 1X y 10X para evaluar el aporte de nutrientes que influye en una mayor cantidad de ovocitos de calidad. En los ovocitos madurados si se encontraron diferencia significativa en los ovocitos madurados seleccionados tanto en el medio 10X y 1X, los cuales fueron elegidos de acuerdo al número de células del *cúmulus* que presentaban, de igual manera el denudados de cigotos mostró diferencia significativa en las dos concentraciones, para el desarrollo de blastocistos no se encontró diferencia significativa, pero si se logró una producción total del 44,46%.

Palabras claves: Ovocitos, Embriones, Medio TCM, Fertilización, Reproducción bovina.

Abstract

The *in vitro* production of embryos allows the optimization of cattle production and reproduction processes, thus favoring the genetic improvement of cattle and therefore obtaining greater production and health benefits in the resulting offspring. In addition, this embryo production technique allows the preservation of animals whose genetic characteristics are about to become extinct. *In vitro* embryo production consists of three stages: oocyte maturation, fertilization of mature oocytes and finally *in vitro* culture of zygotes to blastocysts, so the objective of this research was the production of embryos *in vitro* using a treatment without antioxidants to obtain 40% of viable blastocysts. For oocyte maturation, TCM 199 medium was used at 1X and 10X concentrations to evaluate the nutrient supply that influences a greater quantity of quality oocytes. In the matured oocytes, significant differences were found in the selected matured oocytes in both the 10X and 1X medium, which were selected according to the number of cumulus cells they presented, in the same way the denuded zygote showed significant differences in the two concentrations, for the development of blastocysts not significant difference was found, but a total blastocyst production of 44.46% was achieved.

Keywords: Oocytes, Embryos, Medium TCM, Fertilization, Bovine reproduction.

Capítulo I

Introducción

La biotecnología animal ha permitido aprovechar mayoritariamente la capacidad reproductiva y productiva de los animales, haciendo posible la inseminación artificial (IA), transferencia de embriones (TE), sexado de semen, transferencia y criopreservación de embriones, animales transgénicos y la producción de embriones *in vitro* (PIV) (Hincapié, 2019). Esta técnica permite la conservación de razas de especies que ya están por extinguirse, además permite el aprovechamiento genético de las vacas que presentan problemas de infertilidad, se encuentran en edad adulta o padecen de enfermedades.

La fecundación *in vitro* es una alternativa novedosa y viable para la investigación de mecanismos celulares y moleculares relacionados con las interacciones genéticas, fecundación y desarrollo embrionario en un ambiente artificial. Esta producción de embriones *in vitro* es una de las nuevas técnicas biotecnológicas en la reproducción bovina utilizada como una alternativa para acelerar la producción de animales genéticamente mejorados y también para impedir mediante la aspiración *in vivo* de folículos la eliminación precoz de hembras que son genéticamente privilegiadas y que no pueden transmitir de manera natural estas características a sus crías, logrando así un aprovechamiento de los genes (Diaza, Bustos, Ulloa, & Jaramillo, 2013).

El proceso de producción de embriones *in vitro* consta de tres etapas que son: maduración de oocitos, fecundación de oocitos maduros y finalmente el cultivo *in vitro* de cigotos a blastocistos, siendo la maduración la etapa de mayor importancia ya que de esta depende la siguiente etapa y la calidad de los embriones. Los ovocitos se obtienen en su mayoría de los ovarios de las vacas de matadero o de ganado vivo mediante un proceso llamado Ovum-Pick-Up (Sirard, 2011).

Las hormonas desempeñan un papel muy importante para la producción de embriones siendo las más utilizadas la LH y la FSH ya que estas ayudan a que los oocitos tengan una maduración completa, por otro lado, la adición de suero fetal bovino permite que las células del *cúmulus* se expandan (Gonella, Bustos, Ullo, & Jaramillo, 2013). Existen otros factores importantes a tomar en cuenta en la PIV como por ejemplo el estrés oxidativo ya que este proceso es realizado en ambientes con concentraciones de oxígeno al 20%, en relación al ambiente *in vivo* que tiene de un 3-5% (Park et al., 2005), permitiendo el aumento de las especies reactivas de oxígeno, estas tienen un efecto negativo en ciertas biomoléculas afectando de esta manera el desarrollo embrionario (Vásquez, Torres, & Rojano, 2014). El objetivo principal del presente estudio fue producir un 40% de blastocistos viables sin antioxidantes.

Planteamiento del problema

En la actualidad una gran parte de los procesos de reproducción de animales bovinos se genera de manera natural, sin control genético y al azar, esto evita el aprovechamiento de genes de calidad, además no permite el desarrollo y mejoramiento genético de las nuevas crías.

En los procedimientos de producción *in vitro* de embriones, las condiciones de maduración del oocito afecta la proporción de embriones, planteando que la calidad del oocito es fundamental para alcanzar una buena eficiencia de desarrollo embrionario hasta el estado de blastocistos (Sirard, 2011).

Los ovocitos obtenidos de ovarios de matadero son células lábiles, que están expuestas a varios factores que influyen en su calidad, como por ejemplo la concentración de oxígeno, la exposición a la luz, aspiración, la composición del medio, el suplemento proteico, citoplasma incompleto, el estado fisiológico y reproductivo del donante, el tamaño del folículo, la integridad de las células del cúmulus entre otros (Martínez & Navarro, 2018).

Estos antecedentes señalan la problemática de los oocitos obtenidos de ovarios de matadero que impiden obtener un porcentaje de embriones *in vitro* superior al 40%, por tal razón existe la necesidad de aplicar un protocolo que permita alcanzar porcentajes altos de embriones a través de la PIV.

Justificación

La biotecnología animal es de gran importancia en el sector ganadero ya que gracias a esta es posible realizar el mejoramiento genético del ganado bovino, permitiendo de esa manera obtener mayores beneficios en las nuevas crías óptimas y saludables que contribuirán en el crecimiento económico del sector agropecuario. Ecuador es un país donde el sector agropecuario desempeña un papel muy importante en la economía debido a que este sector representa un 7.7% del producto interno bruto (PIB), desempeñando una importante función en la seguridad alimentaria (INEC, 2020).

La producción de embriones *in vitro* es muy significativa ya que busca la optimización de procesos de producción y reproducción del ganado bovino permitiendo el mejoramiento y la preservación del material genético, a la vez impide la propagación de enfermedades y malformaciones que se pueden dar por medio de la fecundación natural (Hincapié, 2019). La fecundación *in vitro* permite tener la posibilidad de conservar razas o especies que se encuentren en peligro de extinción mediante la creación de bancos génicos donde se puedan almacenar embriones congelados, además la producción de embriones posibilita realizar ciertas modificaciones como por ejemplo producir razas cárnicas en vacas que poseen características para la producción de leche, también permite realizar tratamientos de infertilidad derivados de problemas de fecundación, mortalidad embrionaria precoz y en problemas de ovulación (Mantilla, 2012).

Es importante mencionar que en Ecuador la PIV, recién se está estudiando, por tal razón la presente investigación contribuirá para mejorar el porcentaje de embriones generados a partir del uso de esta biotecnología reproductiva.

Objetivos

Objetivo General

Producir embriones *in vitro* sin antioxidantes para alcanzar un 40% de blastocistos viables

Objetivos Específicos

- 1.- Madurar los ovocitos extraídos de ovarios de matadero sin antioxidantes.
- 2.- Fertilizar los ovocitos madurados *in vitro* sin antioxidantes.
- 3.- Retirar las células del cúmulus de los cigotos.

Capítulo II

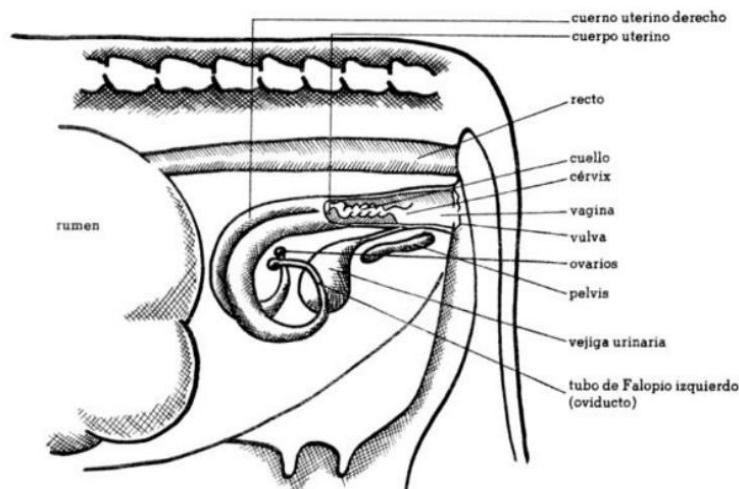
Marco Teórico

Aparato reproductor de la hembra

El aparato reproductor de la hembra está formado por vagina, cérvix, ovarios, oviducto, cuerpo uterino y vulva (Vargas, 2018).

Figura 1.

Fisiología del aparato reproductor bovino



Nota: El aparato reproductor de la hembra. Tomado de Anatomía del aparato reproductor femenino bovino, de (Vargas, 2018).

Los Ovarios: Son de forma ovoide miden entre 1.5 y 5 cm del largo, este tamaño varía durante el ciclo astral (Vargas, 2018). Se encuentran fijados a los cuernos uterinos por el mesoovario y recubierto por la bolsa ovárica. Cumple dos funciones principales, la primera es la citogenética, encargada de producir células reproductivas que generarán los oocitos. La segunda función es la esteroideogénica, es decir la producción de estrógenos y progesterona a partir del colesterol. Los oocitos se producen mediante multiplicación mitótica, seguidamente se da la

primera división meiótica para formar millones de oocitos, esta producción se detiene en la profase. Cuando un ovocito se activa las células epiteliales lo rodean dando así lugar a la formación del folículo y dependiendo del tamaño de este se puede decir que es primario, secundario o terciario, este último estado es donde el ovocito está listo para ser liberado y una vez que esto sucede en la cavidad se forma un cuerpo lúteo el cuál segregará progesterona para el mantenimiento de la preñez (Martínez H. H., 2013).

Oviducto: Presentan una forma fina, larga y flexible con trayectoria sinuosa, inicia en el extremo superior del útero hasta el ovario. Se encarga de transportar los espermatozoides hasta los ovarios y luego lleva al óvulo fecundado hasta el útero (Quezada, 2018).

Útero: Una de las principales funciones que este cumple es transportar los nutrientes al feto en formación por medio de la placenta por relación materno fetal (Vargas, 2018). Este órgano es musculoso y membranoso lo que le permite agrandarse durante la concepción y luego recuperar su tamaño natural, está delante de los cuernos uterinos y se abre detrás de la vagina. El útero se divide en tres partes, cuernos, cuerpo y cérvix. Los cuernos son de forma cónica alargada, su base está unida al cuerpo del útero, del otro extremo se une con el oviducto mediante el orificio tubo - uterino, su función es permitir la nidación e implantación del embrión (Martínez H. H., 2013).

Cérvix: Separa al útero de la vagina, su función es proteger la entrada de cuerpos extraños al útero evitando posibles infecciones. El canal del cérvix presenta cuatro pliegues o anillos los cuales están tapados por un moco cervical (Quezada, 2018).

Vagina: Conducto fibromuscular que se ubica en la parte trasera del cuello uterino hasta la vulva, sirve para recibir el semen y para conducir la orina desde la uretra hacia afuera, además forma parte del canal de parto (Vargas, 2018).

Vulva: Es una abertura que se encuentra en la parte externa del tracto reproductor de la

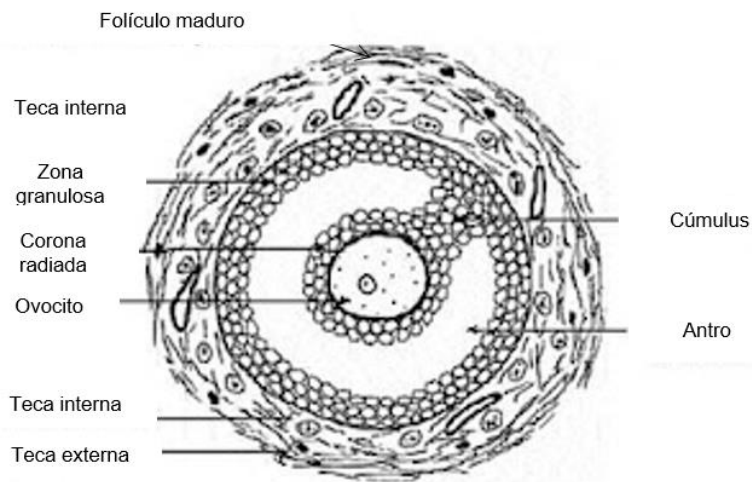
vaca; este permite la unión y conexión con la vagina por medio del vestíbulo. La vulva puede tener un aumento en su tamaño y coloración cuando se encuentre en épocas de celo. En la parte externa de la vulva se encuentra el clítoris, este órgano sexual hace que la hembra se excite ante un estímulo durante la etapa de celo (Días, 2013).

Estructura del ovocito, función y etapas de PIV

Los folículos son parte importante de los ovarios ya que en su interior se encuentran los ovocitos, los mismos que son de vital importancia en los procesos reproductivos y en el ciclo estral, sus funciones principales son la producción de hormonas y de oocitos de buena calidad para poder ser fecundados. Los ovocitos se desarrollan y maduran dentro de los folículos, una vez alcanzada la madurez las células del *cúmulus* se desarrollan y cubre al ovocito (Bielli, 2016).

Figura 2

Estructura del ovocito



Nota: El ovocito está formado por el antro, células del cúmulus, zona granulosa y teca interna. Tomado de fisiología del aparato reproductor de la hembra, por (Melendez, 2019).

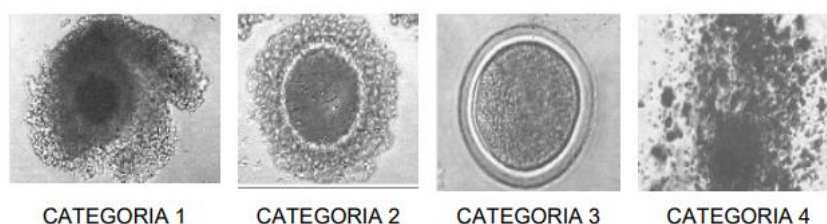
Aspiración folicular

La aspiración folicular es una etapa clave en la producción de embriones bovinos, aquí se recolectan embriones de vacas de matadero. La aspiración de folículos se realiza con una aguja de 18 G para evitar daño en los ovocitos. Después se los coloca en solución de lavado, luego se realiza la selección de acuerdo al número de capas de las células del *cúmulus* (Tirado, 2018).

Células del cúmulus

Figura 3.

Células del cúmulus de ovocito bovino



Nota: Clasificación de ovocitos bovinos según la capa de las células del cúmulus. Tomado de tipos morfológicos de complejos cúmulo-ovocitos, de Urrego, 2017.

En la primera categoría 1 se observa la capa de *cúmulus* completa conformada de tres capas compactas, granulada, coloración grisácea y una zona pelúcida íntegra, la categoría 2 muestra células del *cúmulus* rodeando parcialmente al ovocito, con más de dos capas compactas, la zona pelúcida presenta unas imperfecciones y el citoplasma presenta granulaciones heterogéneas, en la categoría 3 hay cierta cantidad de cúmulus presente pero en una pequeña cantidad, el citoplasma contraído y finalmente en la categoría 4 se puede observar al oocito sin células del *cúmulus*, está totalmente desnudo, también se lo conoce como oocito degenerado. En este grupo se pueden encontrar tres tipos diferentes que son: desnudo, el oocito no se encuentra protegido por células cúmulus, el degenerado presenta citoplasma heterogéneo,

vacuolizado o a su vez fragmentado y finalmente se puede presentar en forma atrésica, aquí el *cúmulus* presenta signos de degeneración citoplasmática (Tinco, 2020).

Maduración de oocitos

El proceso de maduración de ovocitos es el paso del estadio de profase de MI a la MII. El medio de maduración debe contar con todos los nutrientes necesarios para simular lo que sucede en un ambiente *in vivo* durante el ciclo astral bovino. Este medio puede tener suero fetal bovino, LH, FSH, y estradiol, los cuales una vez que ya se hayan colocado los ovocitos se los va a cubrir con aceite mineral. Luego de esto se los deja en incubación durante 24 horas en una incubadora de CO₂ al 5% y una humedad de 90%. El proceso de maduración es muy importante ya que aquí también se da la maduración citoplasmática, está permite que el ovocito soporte la fertilización y pueda aportar los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario (Tirado, 2018)

Fertilización de oocitos

Luego de la maduración se seleccionan los mejores oocitos de acuerdo al grado de las células del *cúmulus* los mismo se incuban con espermatozoides preparados en un medio con fuentes energéticas cómo heparina, piruvato o lactato y albúmina. Los espermatozoides que serán empleados en la fecundación deben estar vivos y con motilidad durante un periodo entre 6 y 24 horas. Posteriormente se realiza un proceso de selección y capacitación el cual nos permitirá eliminar los componentes del plasma seminal, crioprotectores y espermatozoides muertos con baja motilidad (Tirado, 2018).

Ovogénesis

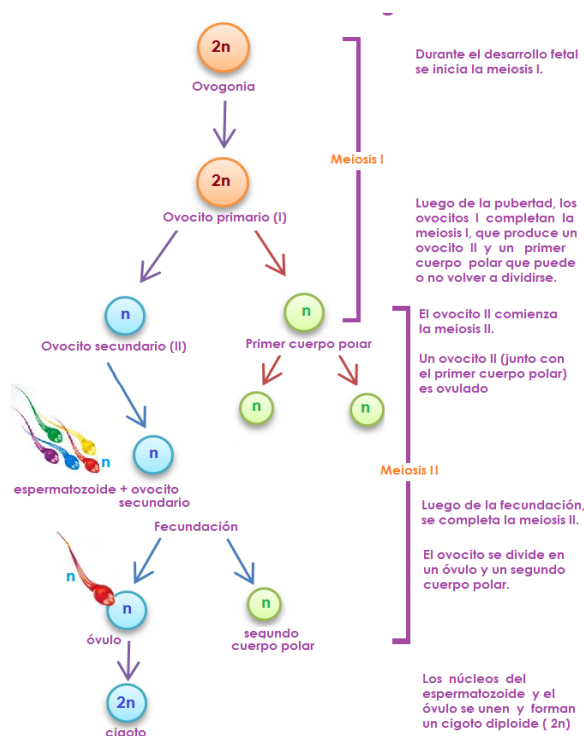
Los ovocitos se originan como células germinales primordiales en el endodermo del saco vitelino embrionario, los cuales migran mediante movimiento amebode por el mesenterio dorsal del intestino por la cresta gonadal, las células germinales son sometidas a un sin número de

divisiones mitóticas, luego estas nuevas células transitan hasta llegar a la cresta gonadal, aquí ya no se producen divisiones mitóticas pero si se forman cordones de células germinales los cuales están encerrados por células epiteliales dando origen así a las ovogonias (Adams & Jaiswal, 2008).

Las ovogonias tiene la primera división meiótica la misma que se queda en la profase I de la meiosis I, solamente las ovogonias y ovocitos que se encuentran cerca de la superficie ovárica permanecen intactos y continúan a la siguiente división, el crecimiento del ovocito es importante para la maduración ya que los ovocitos pequeños no van a tener la capacidad de madurar, al momento que el folículo madura el ovocito reiniciará su meiosis I dando lugar a dos nuevas células con diferente cantidad citoplasmática pero con una misma cantidad de cromosomas dobles, aquí una de estas células va a ser el ovocito primario y la otra será el primer cuerpo polar, este cuerpo permitirá disminuir el número cromosómico pero no afectará los componentes citoplasmáticos que son importantes para el ovocito, luego este mismo cuerpo será expulsado por la región libre de gránulos corticales perteneciente al ovocito. Al finalizar la meiosis I se inicia la meiosis II, esta fase se detiene en la metafase II, aquí la mayor parte de los mamíferos ovulan y si este es fecundado natural o artificialmente se retomará la meiosis y se transformará en óvulo, caso contrario luego de 24 H el ovocito se degenera (Goter, 2008).

Figura 4.

Ovogénesis



Nota: En la ovogénesis se pueden distinguir tres procesos multiplicación crecimiento y maduración. Inicia con las ovogonias $2n$ en el periodo proliferativo y termina en la meiosis cuando haya existido una fecundación durante el periodo de maduración. Tomado de gametogénesis, por Cueva (2021), Portal Académico del UNAM.

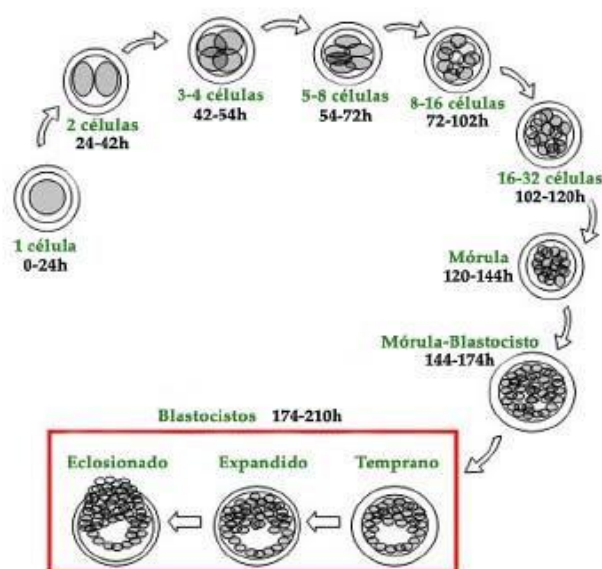
Desarrollo embrionario

Una vez realizada la fecundación el proceso de división celular continua con varias divisiones mitóticas generando el cigoto, mórula y blastocisto. En los estadios iniciales embrionarios no se encuentra activo el genoma del cigoto, el mismo se activará en solamente en las divisiones mitóticas sucesivas. Un oocito fecundado posee todas las proteínas y ARNm necesarios para alcanzar su madurez (Pérez, 2011). El citoplasma contiene las reservas necesarias para la nutrición del embrión, el mismo contiene lípidos, proteínas y polisacáridos.

Por otro lado, el núcleo del ovocito durante la profase I no tienen formado el huso mitótico y su envoltura nuclear no se ha deteriorado, en ese momento se induce una transcripción activa, la misma que permite que los ovocitos primarios acumulen su ARNm que serán utilizados durante su desarrollo posterior (Goter, 2008).

Figura 5.

Cronología de desarrollo embrionario bovino in vitro



Nota: Una vez que se realizó la fecundación se inicia la formación del cigoto y con ello va a iniciar el proceso de división celular para dar lugar a la formación del embrión. Tomado de producción de embriones *in vitro*, de Ríos 2008.

Capítulo III

Ubicación del área de investigación

Ubicación Política

Esta investigación se realizó en la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" sede Santo Domingo, ubicada en la hacienda Zoila Luz, perteneciente a la parroquia Luz de América asentada en la vía Quevedo Km 24.

Ubicación Ecológica

Altitud: Bosque Húmedo Tropical

Temperatura: 25°C

Precipitación: 2860 mm/año

Humedad Relativa: 85%

Ubicación Geográfica

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo.

Latitud: 00°24'44" Sur

Longitud: 78°18'32" Oeste

Altitud: 270 msnm.

Figura 6.*Ubicación geográfica*

Nota- Ubicación geográfica de las instalaciones donde se ejecutó el proyecto de integración curricular. Fuente: Elaboración propia.

Materiales

Insumos

- Vaso de precipitación
- Pipetas automáticas
- Erlenmeyer
- Pinzas
- Espátulas
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Cajas Nunc
- Ajuga 18G
- Jeringuillas
- Probeta
- Puntas de pipeta
- Gradilla
- Tubos falcon
- Balón de aforo
- Porta objetos

Equipos

- Microscopio de contraste de fase con platina térmica
- Incubadora de dióxido de carbono
- Cámara de flujo laminar
- Platinas térmicas
- Baño María
- Estufa
- Estéreomicroscopio
- Equipo CASA
- Centrífuga
- Cámara de cultivo
- Bortex
- Potenciómetro
- Balanza Analítica
- Termómetro
- Autoclave
- Bidestilador de agua

Reactivos

- SFB (Suero fetal bovino)
- Glucosa
- Glicina
- Solución HEPES
- Carbonato Ácido de Sodio
- Estreptomina
- Penicilina
- Percol 90%
- KH_2PO_4 (Fosfato Monopotásico)
- Na_2HPO_4 (Fosfato Sódico)
- Piruvato de Sodio
- NaCl (Cloruro de Sodio)
- KCl (Cloruro de Potasio)
- Streptomina-penicilina
- Lactato de Sodio
- Aceite mineral
- TCM 199
- FSH (Hormona Foliculo Estimulante)
- LH (Hormona Leutinizante)
- Insulina
- Rojo fenol
- Heparina
- Gentamicina
- BSA (Albúmina de Suero Bovino)

- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Cloruro de magnesio hexahidratado)
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Cloruro de calcio dihidratado)

Biológicos

- Ovarios bovinos
- Ovocitos
- Semen

Metodología

Solución de lavado

Se colocó 800 ml de agua bidestilada en un balón de aforo, luego se pesó 8,5 g de NaCl, posteriormente se tomó 80 μ l de streptomina-penicilina y se colocó en el balón de aforo hasta completar 100 ml, finalmente se mezcló y se almacenó a 4 °C

Solución Dulbecco

En un vaso de precipitación de 1000 mL se colocó alrededor de 700-800 mL de agua pura, luego se añadió las sales en el orden que se detalla, 8000 mg/L de NaCl (Cloruro de Sodio) (100 mM), 200 mg/L de KCl (Cloruro de Potasio) - (3,1 mM), 200mg/L de KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico), 1135 mg/L de Na_2HPO_4 (Fosfato monosódico) – (0,3 mM), 100 mg/ de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Cloruro de Magnesio hexahidratado) - (0,4 mM) y 132 mg/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Cloruro de calcio dihidratado) – (2,0 mM), se agitó constantemente hasta lograr que se disuelva completamente la disolución.

Solución de aspiración de oocitos

Se tomó 100 mL de la solución Dulbecco, luego en un vaso de precipitación previamente esterilizado se agregó 100 μ L de gentamicina, 300 mg de BSA (Albúmina de Suero Bovino), se

dejó que se disuelva solo (sin agitación). Una vez que se ha disuelto todo se llevó al baño María (37°C) para luego utilizarlo.

Medio de maduración TCM 10x – 1x

Se colocó en un tubo falcon 9 mL de TCM 199 stock, 1 mL de FSB (Suero Fetal Bovino), 10 µL de gentamicina, 10 µL de piruvato de sodio (0,2 mM), 10 µL de epidermal, 10 µL de LH (Hormona Leutinizante) y 15 µL de FSH (Hormona Folículo Estimulante), luego se dejó reposar durante 2 horas en la incubadora de CO₂.

Medio SP-Talp

En un vaso de precipitación se colocó 70mL de agua ultrapura, después se añadió sales en el siguiente orden: 584,4 mg NaCl (Cloruro de Sodio) (100Mm), agregar 23,1 de mg KCl (Cloruro de Potasio)- (3,1 mM), añadir 3,6 mg de NaH₂PO₄ (Fosfato monosódico) – (0,3 mM), 29,4 mg de CaCl₂*2H₂O (Cloruro de calcio dihidratado) – (2,0 mM), 8,1 mg de MgCl₂*6H₂O (Cloruro de Magnesio hexahidratado) –(0,4 mM), 368 µL de lactato de Sodio- (21,6 mM), 238 mg de HEPES- (10mM), rojo fenol, colocar dependiendo de la concentración: 0,5%= 200 µl o 1%= 100 µl. Una vez que todos estos compuestos se hayan mezclado aforar con agua ultrapura hasta completar un volumen de 100 mL, finalmente almacenar en refrigeración

Medio de Fecundación FERT- Talp

En un vaso de precipitación se colocó 70 mL de agua ultrapura, se añadió 666 mg de NaCl (Cloruro de Sodio) (100Mm), 23,8 mg de KCl (Cloruro de Potasio)- (3,1 mM), 4,8 mg de NaH₂PO₄ (Fosfato monosódico) – (0,3 mM), 24,4 mg de CaCl₂*2H₂O (Cloruro de calcio dihidratado) – (2,0 mM), 10 mg de MgCl₂*6H₂O (Cloruro de Magnesio hexahidratado) – (0,4 mM), 187 µL de lactato se Sodio, 210 mg de NaHCO₃ (Bicarbonato de Sodio), 100 µL de rojo fenol.

Después se aforó con agua ultrapura hasta completar un volumen de 100 ml, esta solución se preparó con 24 horas de antelación.

FERT- Talp enriquecido

En un tubo falcon se colocó 10 mL de solución Fert- Talp, 10 μ L de Piruvato de Sodio (0,2 M), 10 μ L de gentamicina, 60 mg de BSA FV (Albúmina de Suero Bovino) se dejó disolver sin movimiento. Se filtró esta solución y se colocó en la incubadora de CO₂ dos horas antes de realizar el proceso de fecundación

Procesamiento del semen

Se descongeló una pajueta de semen elaborada por el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la ESPE, se evaluó la motilidad en el equipo CASA, el semen se colocó en dos tubos falcon, con 150 μ L de percol al 90%-45%, se llevó a centrifugación durante 25 minutos a 1000 rpm, luego de esto se retiró el sobrenadante cuidadosamente sin tocar el pellet, después se añadió 6 mL de solución SP-TALP y se volvió a centrifugar a 1000 rpm durante 6 minutos. Finalmente se retiró nuevamente el sobrenadante y se agregó 300 μ l de solución Fert- Talp enriquecido.

Fertilización

Se formó gotas de 50 μ l de la solución de fertilización en cajas Nunc, luego con la ayuda del estereomicroscopio se seleccionó los oocitos con mayor grado de célula del cúmulus y se colocó en las gotas, se selló con aceite mineral, y se llevó a la incubadora de CO₂ durante 24H.

Preparación de solución Soft

En un vaso de precipitación se colocó 100 ml de agua ultra pura, luego se añadió 672,5 μ L de NaCl (Cloruro de Sodio) (4 M), 179 μ L de KCl (Cloruro de Potasio) (1 M), 297,5 μ L de KH₂PO₄ (Fosfato monopotásico) - [0,1 M], 42,75 μ L de CaCl₂*2H₂O (Cloruro de Calcio dihidratado)

(1 M), 125,5 µL de MgCl₂ 6H₂O, (Cloruro de Magnesio hexahidratado) – (0,1 mM), 52,5 mg de NaHCO₃ (Bicarbonato de Sodio), 37,5 µL de piruvato de sodio, 11,75 µL de lactato de sodio, 250 µL de glutamina, 250 µL de glucosa, 300 µL de taurina, 125 µL de glicina, 500 µL de BME (Basal Medium Eagle) 50X, 250 µL de MEM (Medio Esencial Mínimo) 100X y 25 µL de insulina. Se mezcló y se llevó a incubación durante 3 horas en la incubadora de CO₂.

Denudado de embriones

Se colocó los embriones en un tubo falcon con solución Dulbecco, luego se llevó a centrifugación a 1000 rpm durante 4 minutos, después se colocó estos embriones en placas Petri para seleccionar a los posible cigotos que no presentaban las células del cúmulus, se repitió este proceso hasta la eliminación completa de estas células, por último, en placas Nunc, se formó gotas de 65 µL con solución Soft, se agregó los posibles cigotos y se llevó a la incubadora de CO₂ a 37°C, humedad relativa del 90% y 5% de CO₂, entre 66 horas a 72 horas, se observó diariamente el proceso de división celular.

Para calcular el porcentaje de blastocistos viables se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Blastocistos} = \frac{N^{\circ} \text{ de cigotos denudados}}{N^{\circ} \text{ de blastocistos}}$$

Diseño experimental

Para la presente investigación se planteó un análisis estadístico de un factor para evaluar y comparar el efecto producido por la variación de la concentración del medio de maduración para la producción de embriones bovinos y su efecto en el desarrollo de las células del cúmulus. Se empleó una prueba paramétrica de ANOVA de un factor y la prueba Tukey con un porcentaje de significancia del 5 %, considerando la distribución de los datos como normal. El programa estadístico que se usó fue InfoStat Versión estudiantil.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

Para el presente estudio se utilizó un total de 266 ovarios, en el primer ensayo se recolectó 63, en la segunda repetición se recogió 80 ovarios y 123 para el ensayo final que representa el mayor número, ver la tabla 1. El porcentaje de ovocito recuperados de calidad fue del 68,27%, este porcentaje está dentro de los valores aceptables en la recuperación de ovocitos de matadero.

Tabla 1.

Cantidad de ovocitos recolectados

Réplica	Ovarios	N° de ovocitos recolectados	N° de ovocitos seleccionados
1	63	112	73
2	80	186	118
3	123	304	220

Nota: En la primera columna se observa el número de ovarios recolectados en el lugar de faenamiento municipal del cantón Santo Domingo, en la segunda columna se nota que a mayor número de ovarios usados el número de ovocitos recolectados aumenta, no así en la tercera columna el número de ovocitos seleccionados es menor al número de ovocitos recolectados debido a que el parámetro de selección de los ovocitos fue el número de capas de células del *cúmulus* y no todos los ovocitos recolectados presentaban el número ideal de capas de células del *cúmulus*. Fuente: elaboración propia

(Gordon, 2003) menciona que la cantidad y la calidad de ovocitos extraídos puede tener varios factores que afecten su producción, estos pueden ser los errores humanos cometidos al momento de realizar la aspiración folicular, la temperatura, edad y el número de partos que ha tenido el animal, siendo estos dos últimos factores importantes que se toman en cuenta ya que

los ovarios son procedentes de matadero y la calidad del ganado no es la más óptima ya que en su mayoría va ganado de descarte. De acuerdo con (Kątska, 1984) cuando la edad del ganado está cercana a la vejez su nivel de fertilidad va a disminuir, provocando de esa manera cambios foliculares y endócrinos. Cuando un animal se encuentra en edad avanzada la cantidad de gonadotropinas se eleva como consecuencia de esto va a disminuir la concentración de hormonas esteroideas (Moussa, 2015).

Maduración de ovocitos

Durante el proceso de maduración se empleó 117 ovarios para el medio TCM 1X, como resultado se obtuvo 155 ovocitos, mientras que para el medio TCM 10X se utilizó 149 ovarios y se obtuvo 226 ovocitos con células del *cúmulus* de grado I, II y III. En la tabla 2 se muestra que el número de ovocitos madurados respecto al número de réplicas si tuvo una diferencia significativa con un valor de $p= 0,0276$, es decir que una de las réplicas fue mejor que la otra, respecto a la concentración del medio de maduración no se obtuvo una diferencia significativa con un valor de $p= 0,0667$, pero como este valor está cercano al aceptable podemos decir que hay una diferencia en el uso del medio de maduración 1X y 10X.

Tabla 2.

Resultados ANOVA de ovocitos madurados

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón de F	Valor P
Medio de maduración	840,17	1	840,17	13,51	0,0667
Réplica	4377,00	2	2188,50	35,20	0,0276
Residuo	124,33	2	62,17		
Total	5341,50	5			

Nota: Se obtuvo diferencia significativa en la réplica. Fuente: elaboración propia.

En la tabla 3 se observa que existe diferencia significativa en la primera fase de la producción *in vitro* de embriones, correspondiente a la maduración de ovocitos, $p= 0,0276$, es decir, que el proceso de maduración de ovocitos fue exitoso.

El ANOVA para los datos de la tabla 3 muestra diferencias significativas tanto para el medio de maduración como para la réplica, el valor de p fue de 0,0371 y 0,0133 respectivamente.

Tabla 3.

Resultados ANOVA para ovocitos madurados seleccionados

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón de F	Valor P
Medio de maduración	661,50	1	661,50	25,44	0,0371
Réplica	3865,63	2	1932,67	74,33	0,0133
Residuo	52,00	2	26,00		
Total	4578,83	5			

Nota: Se obtuvo diferencia significativa en la réplica y en el medio de maduración.

Fuente: elaboración propia.

En la tabla 4 se muestra los resultados de la prueba de Tukey en cuanto a los ovocitos maduros no hay diferencia significativa por lo cual se recomienda usar cualquiera de los dos medios de maduración TCM para obtener una maduración exitosa con aumento de células del *cúmulus*, pero en cuanto a los ovocitos viables los dos medios muestran diferencias significativas, siendo el medio TCM 10X, el que mejor rendimiento presenta.

Tabla 4.

Resultados prueba de Tukey de ovocitos madurados

Medio de maduración TCM	Ovocitos madurados	Ovocitos viables
1X	51,67 ^A	41,67 ^A
10X	75,33 ^A	62,67 ^B

Nota: Los ovocitos madurados viables hace referencia a la cantidad de ovocitos madurados seleccionados.

En la tabla 5 se muestra que la mejor réplica en cuanto a los ovocitos viables fue el número 3, pues las réplicas 1 y 2 produjeron un número menor de ovocitos viables, mientras que las réplicas fueron iguales para los ovocitos madurados.

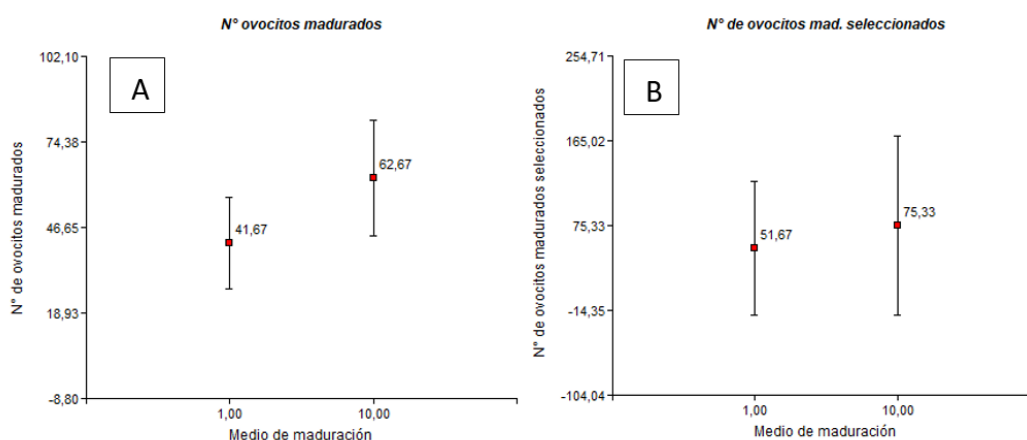
Tabla 5.

Resultados prueba de Tukey de número de réplicas de ovocitos madurados

Réplica	Ovocitos madurados	Ovocitos viables
1	35,50 ^A	22,50 ^A
2	55,00 ^{AB}	49,50 ^A
3	100,00 ^B	84,50 ^B

Figura 7.

Influencia del medio de maduración TCM 1X - 10X



Nota: (A) Influencia del medio de maduración TCM 199 en sus diferentes concentraciones 1X – 10X. (B) Influencia del medio de maduración en la cantidad de ovocitos madurados seleccionados. Fuente: elaboración propia.

En la figura 7A no hay una diferencia considerable entre los dos medios empleados, coincidiendo de esa manera con el valor de significancia obtenido. La figura 7B muestra una diferencia significativa respecto al medio de maduración para los ovocitos maduros seleccionados. Para la selección de ovocitos se tomó en cuenta el número de capas de células del *cumulus oophorus*.

Existen varios factores que pueden afectar a la maduración de los ovocitos, estos pueden ser el tipo de técnica de aspiración empleada, el número de aguja ya que es aquí donde se

pueden destruir las capas de las células del *cúmulus* que recubren al ovocito, este tipo de células tienen un papel fundamental en la maduración nuclear y también en la maduración citoplasmática (Mayes & Sirard, 2001).

Para realizar la selección de ovocitos se tomó en cuenta la clasificación de (Hawk, 1994), los ovocitos seleccionados de buena calidad presentaron varias capas de células del *cúmulus*, los ovocitos de mediana calidad solo tenían una o dos capas de células del *cúmulus*, por último los ovocitos descartados fueron aquellos que no presentaban ninguna capa de células del *cúmulus*.

La cantidad de vitaminas, aminoácidos y concentración influyen en la cantidad del desarrollo de las células del *cúmulus* ya que estas tienen un aporte importante en el proceso metabólico de desarrollo y maduración de los ovocitos. La hormona LH aumenta la glicólisis mediante la oxidación mitocondrial aumentando de esta manera la energía disponible para el ovocito (Zuelke, 1998), además evita que se produzcan efectos inhibitorios sobre el gameto permitiendo la ruptura de la vesícula germinal (Downs, 1993), la FSH permite la expansión de células del *cúmulus* a través de la síntesis de piruvato y ácido hialurónico. El aporte proteico en el medio de maduración de ovocitos es importante y es dado por el suero fetal bovino (Ball, 1993).

Maduración de cigotos y blastocistos

Una vez culminada la maduración se realizó la fertilización de ovocitos, aquí se obtuvo un porcentaje de fertilización del 41,6 % (52/125) y 33,57% (48/143) de desarrollo embrionario respecto a los ovocitos madurados en TCM 1X, mientras que en el medio TCM 10X se logró una fertilización de 71,80 % (135/188) y 66,43 % (95/143) de desarrollo embrionario. Según las investigaciones de (Aray, 2001) menciona que entre el 10 y 40% de la cantidad de los ovocitos seleccionados llegan hasta blastocistos, coincidiendo de manera acertada con los resultados obtenidos en todas las fases.

En el proceso de denudado de cigotos se obtuvo una diferencia significativa tanto en el medio de maduración como en las réplicas realizadas con un valor de $p=0,0346$ y $0,0283$ respectivamente, ver tabla 6.

Tabla 6.

Resultados de ANOVA para ovocitos denudados

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón de F	Valor P
Medio de maduración	96,00	1	96,00	27,43	0,0346
Réplica	240,33	2	120,17	34,33	0,0283
Residuo	7,00	2	3,50		
Total	343,33	5			

En la tabla 7 se muestra que el medio TCM 199 10X se obtuvo 19,33 cigotos denudados, este resultado es significativo, es decir que al utilizar esta concentración se obtuvo una producción más alta en comparación con la concentración de TCM 199 1X. La réplica 1 muestra diferencia significativa al comparar con las réplicas 2 y 3, ver tabla 8.

Tabla 7.

Resultados prueba de Tukey de cigotos denudados (medio TCM)

Medio de maduración TCM	Cigotos denudados
1X	11,33 ^A
10X	19,33 ^B

Tabla 8. Resultados prueba de Tukey de cigotos denudados (réplica)

Réplica	Cigotos denudados
1	6,50 ^A
2	18,50 ^B
3	21,00 ^B

Se logró una producción total de 41 blastocistos, en la primera repetición se produjo 1 blastocisto en la segunda se obtuvo 18 blastocistos y en la tercera repetición se logró 22

blastocistos, logrando en este último una mayor producción de blastocistos durante el estudio, ver la tabla 9.

Tabla 9.

Cigotos madurados y blastocistos

Réplica	Medio de maduración	Cigotos madurados	Blastocistos
1	1	7	0
1	10	11	1
2	1	18	7
2	10	39	11
3	1	23	8
3	10	45	14

Nota: La cantidad de blastocistos obtenida depende de la cantidad de cigotos madurados obtenidos. Fuente: elaboración propia

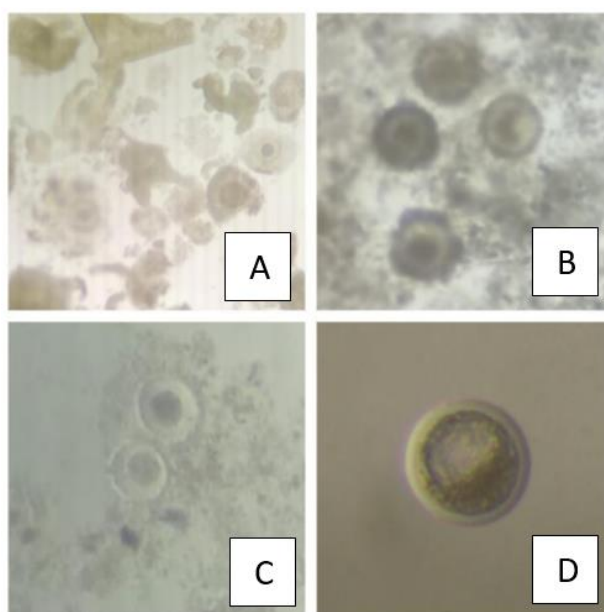
La producción de embriones puede ser afectada por algunos factores entre ellos la recolección de los ovarios, las técnicas de obtención de ovocitos, la maduración, las hormonas empleadas, las fuentes vitamínicas y proteicas, el uso de antioxidante, la fecundación y el cultivo *in vitro*. Al ser este un estudio donde se emplea ovarios de matadero sería aconsejable realizar un estudio con el uso de antioxidantes para comparar la producción. El daño oxidativo provoca que las funciones mitocondriales no tengan la eficacia normal, por esta razón se recomienda emplear antioxidantes para mejorar la funcionalidad de las mitocondrias (Restrepo, 2020).

La calidad y la motilidad del semen se ven reflejados en el número de ovocitos fecundados, el uso de crioprotectores son importantes en la conservación del estado morfológico del semen y su porcentaje de motilidad al momento del descongelamiento ya que mientras más alta sea la motilidad del semen empleado el número de ovocitos fecundados va a ser mayor. Para la repetición 3 se utilizó un semen con porcentaje de motilidad del 73.6% lo que se ve reflejado en el número de cigotos madurados.

En la figura 8 se observa las fases que atraviesa el ovocito hasta llegar a blastocisto, A) ovocitos maduros con células del *cúmulus*, B) ovocito fecundado con semen congelado producido en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, C) mórula, estadio generado después de la división del cigoto, D) blastocisto, en el presente estudio se obtuvo el 44,46% de blastocistos viables, porcentaje mayor al del tema propuesto.

Figura 8.

Desarrollo de ovocito hasta formar blastocisto



Nota: (A) Ovocito madurado, (B) ovocito fecundado, (C) cigoto, (D) blastocistos. Fuente: elaboración propia.

Capítulo V

Conclusiones

Se logró producir embriones *in vitro* con ovarios de matadero mediante la técnica de aspiración folicular alcanzando un 44,46% de blastocistos viables.

El medio TCM 199 en concentraciones 1X y 10X no mostraron diferencias significativas en la cantidad de ovocitos madurados seleccionados, por lo que el uso de este es indistinto, en cualquiera de los dos casos se obtendrán ovocitos con varias capas de células del *cúmulus*.

Se realizó la fertilización de ovocitos con semen con un porcentaje elevado de motilidad de los espermatozoides, lo que contribuyó para alcanzar un porcentaje elevado de blastocistos.

Capítulo VI

Recomendaciones

Mantener a los ovarios en el traslado desde el lugar de faenamiento hasta el laboratorio a una temperatura entre 33- 37°C para evitar que los oocitos se degeneren.

Mantener un ambiente aséptico dentro del laboratorio para evitar la contaminación de los medios de cultivo.

Realizar el denudado de cigotos de forma muy técnica ya que los ovocitos fecundados pueden destruirse con facilidad.

Capítulo VII

Bibliografía

- Adams, G., & Jaiswal, R. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69(1), 72 - 80. From <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07005961?via%3Dihub>
- Ball, G. (1993). Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction*, 717-725. From Fecundación in vitro en bovinos: Avances en el manejo de gametos.
- Bielli, A. (2016). Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle. *Scielo*, 376-392.
- Cueva, C. d. (2021). *Ovogénesis*. From Portal académico de México: <https://portalacademico.cch.unam.mx/biologia1/gametogenesis/ovogenesis>
- Días, A. S. (2013, Noviembre 16). *Aparato reproductor bovino*. From <https://es.scribd.com/document/187816035/APARATO-REPRODUCTOR-BOVINO>
- Díaz, Á. M., Bustos, J. E., Ulloa, S. M., & Jaramillo, L. C. (2013, Junio). Overview of the production of bovine. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(1), 65-80. From <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285691>
- Downs, S. (1993). Factor affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology*, 65-79.
- Gonella, D., Bustos, J. A., Ulloa, S. B., & Jaramillo, L. C. (2013, Junio). *Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro*. From Dialnet: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285691>

- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos* (Segunda ed.). Dublin: CABI Publishing.
- Goter, R. M. (2008). Fisiología del gameto femenino . In *Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito* (pp. 507-508). From http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_41.pdf
- Hawk, H. (1994). Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, 1571-1583.
- Hincapié, J. (2019, Marzo 13). *La Fertilización in vitro (FIV) en bovinos: una Biotecnología Reproductiva innovadora al servicio del mejoramiento genético*. From Zamorano: <https://www.zamorano.edu/2019/03/13/la-fertilizacion-in-vitro-fiv-en-bovinos-una-biotecnologia-reproductiva-innovadora-al-servicio-del-mejoramiento-genetico/>
- INEC. (2020, Junio 18). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua* . From <https://anda.inec.gob.ec/anda/index.php/catalog/777>
- Kątska, L. (1984). Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Elseiver*, 451 -460.
- Mantilla, M. (2012). *Fecundación in vitro como alternativa para el mejoramiento genético en bovinos*.
- Martínez, H. H. (2013). *Aparato Reproductor de La Hembra*. From Scribd.
- Martínez, S. H., & Navarro, M. d. (2018). Main morphological alterations in ovine oocytes matured in vitro. *Scielo*, 49 - 66.
- Mayes, M., & Sirard, A. (2001). The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, 911 - 922.

Melendez, V. (2019, Abril 11). *GASTRULAÇÃO*. From <http://embriologiaveterinariauem.blogspot.com/>

México, U. N. (2021). *Reproduccion de animales domesticos*. México: Digital.

Moussa, M. (2015). Maternal control of oocyte quality in cattle "a review". *Animal Reproduction Science*(155), 11-27.

Pérez, M. (2011). *Producción de embriones in vitro. Cultivo in vitro*. From Noticias Cientificas.

Quezada, A. O. (2018). *Manual de Biotecnologías Reproductivas Volumen II*. From Repositorio UNAM: <http://132.248.9.195/ptd2018/septiembre/0779965/0779965.pdf>

Quispe, C., Ancco, E., Solano, J., Unchupaico, I., & Mellisho, E. (2018). Embryonic development capacity of bovine oocytes aspired by ovum pick-up and from slaughterhouse ovaries. *Scielo*, 88 - 99.

Restrepo, C. (2020). *La influencia de la edad materna en los ovocitos bovinos y su respuesta al Resveratrol en la producción in vitro de embriones*. From <https://repository.ces.edu.co/handle/10946/5130>

Sirard, M.-A. (2011, Junio). *J Assist Reprod Genet*, 28(6), 483-488. From <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3158252/>

Tirado, J. J. (2018). Transfer of bovine embryos in vitro. *Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 510 - 550.

Torres, V., Urrego, R., Echeverri, J., & López, A. (2019). estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. *Scielo*, 433 - 459.

Urrego, R. (2017). *Tipos morfológicos de complejos cúmulo-ocitos*.

Vargas, P. E. (2018). *Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes.*

From <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>

Vásquez, N. A., Torres, V., & Rojano, B. (2014). EFFECT OF ASCORBIC ACID DURING BOVINE OOCYTES IN VITRO MATURATION ON REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) PRODUCTION AND EMBRYO DEVELOPMENTAL COMPETENCE. *Scielo*, 718 - 743.

From Scielo: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642014000200016&script=sci_arttext&tlng=en

Zuelke, G. (1998). Luteinizing hormone enhanced in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod.*, 71-77.