



“Evaluación de dos protocolos de Fertilización in Vitro (Fiv corta y larga) en el clivaje de ovocitos obtenidos por OPU in vivo.”

Mendoza Chapilliquin, Fabian Steeven y Sandoval Sisalema, Luis Felipe

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria Santo Domingo

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Agropecuaria.

Dr. Félix Agustín Valdivieso Plaza

11 Agosto del 2021



Urkund Analysis Result

Analysed Document: "Evaluación de dos protocolos de v
Fertilización in Vitro (Fiv corta y larga) en el clivaje de ovocitos obtenidos
por OPU in vivo.".pdf (D110456236)

Submitted: 7/14/2021 4:55:00 PM

Submitted By: fsmendoza@espe.edu.ec

Significance: 0%

Analysis address favaldivieso.espe@analysis.urkund.com

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**FELIX AGUSTIN
VALDIVIESO
PLAZA**

.....
Dr. Valdivieso Plaza, Félix Agustín

C. C: 1301910871



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Evaluación de dos protocolos de Fertilización in Vitro (Fiv corta y larga) en el clivaje de ovocitos obtenidos por OPU in vivo.”** fue realizado por el señor **Mendoza Chapilliquin, Fabian Steeven y Sandoval Sisalema, Luis Felipe;** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 11 de agosto del 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**FELIX AGUSTIN
VALDIVIESO
PLAZA**

.....
Dr. Valdivieso Plaza, Félix Agustín

C. C: 1301910871



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotros, **Mendoza Chapilliquin, Fabián Steeven y Sandoval Sisalema, Luis Felipe**; con cédulas de ciudadanía **n°172203196-8** y **n°171527605-9** respectivamente declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de dos protocolos de Fertilización in Vitro (Fiv corta y larga) en el clivaje de ovocitos obtenidos por OPU in vivo.”** es de nuestra 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, 11 Agosto del 2021

.....
Mendoza Chapilliquin, Fabian Steeven

C.C.:172203196-8.

.....
Sandoval Sisalema, Luis Felipe

C.C: 171527605-9



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotros **Mendoza Chapilliquin, Fabian Steeven y Sandoval Sisalema, Luis Felipe;**, con cédulas de ciudadanía **n°172203196-8** y **n°171527605-9**, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Título: “Evaluación de dos protocolos de Fertilización in Vitro (Fiv corta y larga) en el clivaje de ovocitos obtenidos por OPU in vivo.”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo, 11 Agosto del 2021

.....
Mendoza Chapilliquin, Fabian Steeven

C.C.:172203196-8.

.....
Sandoval Sisalema, Luis Felipe

C.C: 171527605-9

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación a mi querida Madre Liliana Chapilliquin por brindarme su amor y apoyo en esta etapa de mi vida con tantas caídas y victorias que lo hemos superado juntos, además por los valores que ha forjado en mi persona los cuales han sido fundamental para mi desarrollo personal y académico.

A mi persona por el esfuerzo y perseverancia, valores los cuales han sido de gran importancia para la culminación del presente trabajo.

A mi familia por compartir sus consejos y ayuda en los momentos que más lo he necesitado en el transcurso de mi preparación profesional.

A mis amigos por el tiempo compartido y ánimos durante el desarrollo de nuestra formación académica.

Fabián Steeven Mendoza Chapilliquin

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedicamos principalmente a Dios, por ser el inspirador para seguir el camino que me gusta y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mi madre Martha Sisalema por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, por inculcar en mí el ejemplo del esfuerzo y valentía de no temer a todas las adversidades y me enseñó que el mejor conocimiento que se puede tener es el que se aprende por sí mismo.

A mi padre Mauricio Cisneros con apoyo incondicional, amor y confianza permitieron que logre culminar mi carrera profesional

A mis hermanos por ser en todo momento mi fuente de inspiración, ayuda y ejemplos a seguir.

A mi persona por demostrarme la decisión el esfuerzo y la constancia que me ha permitido obtener todos los logros.

A mi familia por los valores y sugerencias brindadas en todo el camino para obtener mi título profesional.

A mis amigos por su tiempo compartido y buenas experiencias vividas en la etapa de formación profesional.

Luis Felipe Sandoval Sisalema

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Extensión Santo Domingo, en especial a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, por la oportunidad de formarnos profesionalmente, a sus docentes por todos los conocimientos impartidos.

A nuestro director de tesis Dr. Félix Valdivieso por su ayuda para la realización del presente trabajo.

Al Ing. Andrés Vargas por su predisposición y asesoría en la fase de laboratorio para el desarrollo del proyecto de investigación.

Al Dr Gelacio Gómez, Ing. Jorge Lucero e Ing. Vinicio Uday, por su aporte y correcciones en el anteproyecto de la investigación.

Fabián Steeven Mendoza Chapilliquin

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por bendecirme la vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

A mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios inculcados.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Extensión Santo Domingo, en especial a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, por la oportunidad de formarnos profesionalmente, a sus docentes por todos los conocimientos impartidos.

A nuestro director de tesis Dr. Félix Valdivieso e Ing. Andrés Vargas por su ayuda y predisposición para la realización del presente trabajo.

Al Dr Gelacio Gómez, Ing. Jorge Lucero e Ing. Vinicio Uday, por su aporte y correcciones en el anteproyecto de la investigación.

Luis Felipe Sandoval Sisalema

ÍNDICE DE CONTENIDO

Caratula.....	1
Urkund Analysis Result	2
Certificacion.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Aautorizacion de publicacion	5
Dedicatoria.....	6
Dedicatoria.....	7
Agradecimientos	8
Índice de contenido	10
Índice de tablas	14
Índice de figuras.....	15
Resumen	16
Abstrac.....	17
Capitulo I.....	18
Introducción.....	18
Capitulo II.....	21
Revisión de literatura	21
Procesos de maduración de ovocitos	21
Maduración in vivo.....	21

Maduración in vitro.....	22
Método de transporte de ovocito.....	22
Método de obtención de ovocitos.....	23
Técnica de aspiración folicular.....	24
Clasificación de ovocitos.....	26
Maduración de ovocitos.....	27
Clivaje de ovocitos.....	29
Clasificación ovocitaria.....	30
Calidad embrionaria.....	31
Factores que afectan al ovocito.....	31
Edad del animal.....	32
Categorías de los animales.....	32
Ciclo estral.....	33
Tamaño de ovarios.....	33
Condición nutricional y medioambiental.....	33
Capitulo III.....	34
Métodos y materiales.....	34
Ubicación del área de investigación.....	34
Ubicación política.....	34
Ubicación ecológica.....	34
Ubicación geográfica.....	34
Materiales.....	36
Métodos.....	37

Preparación de medios.....	38
Manejo de reproductoras	43
Obtención de ovocitos	43
Búsqueda y selección de ovocitos	44
Maduración in vitro de ovocitos.....	44
Métodos de separación de espermatozoides móviles	45
Proceso de fecundación in vitro	45
FIV corta sin separación espermática	46
Enjuague de los ovocitos	46
Cultivo in vitro	47
Análisis estadístico	47
Determinación económica	47
Variables de estudio.....	48
Número de ovocitos recolectados.....	48
Número de ovocitos aptos para la incubación.....	48
Porcentaje de maduración in vitro.....	48
Porcentaje de fertilización in vitro.....	48
Porcentaje de embriones viables.....	48
Capitulo IV.....	49
Resultados.....	49
Número de ovocitos recuperados	49
Maduración de los ovocitos	50
Número de embriones viables	52

Calidad de los ovocitos	53
Capitulo V.....	57
Discusiones	57
CAPITULO VI.....	60
Conclusiones	60
Recomendaciones.....	61
Capitulo VII.....	62
Bibliografia	62

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Estado de Desarrollo.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 2. Calidad de los embriones.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 3. Medios de maduración in Vitro.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 4. Medio de cultivo de Embriones SOF (fluido del sistema oviductal).....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 5. Medio TALP-Hepes (holding).....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 6. Medio de cultivo para FIV corta y larga.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 7. SDS (diluyente de semen) y SWS (solución para lavado de semen).....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 8. Número de ovocitos recuperados.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 9. Maduración de los ovocitos.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 10. Fecundación de los ovocitos.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 11. Número de embriones viables.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 12. Estado y Calidad de los ovocitos en los dos protocolos.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 13. Análisis económico de los métodos de Fertilización In Vitro.....</i>	<i>55</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Esquema del movimiento del ovocito en el oviducto del aparato reproductor femenino..</i>	
.....	23
Figura 2. <i>Categoría de ovocito grado I.</i>	26
Figura 3. <i>Categoría ovocito grado II.</i>	26
Figura 4. <i>Categoría de ovocito grado III</i>	27
Figura 5. <i>Categoría de ovocito grado IV</i>	27
Figura 6. <i>Protocolos para capacitación para semen bovino</i>	29
Figura 7. <i>Ubicación geográfica del proyecto de investigación</i>	35

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar dos protocolos de fertilización in vitro en el clivaje de ovocitos obtenidos por OPU, los distintos protocolos fueron analizados utilizando el método de Fiv corta y fiv larga, además se cuantificó el número de embriones viables. El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE ubicada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, Parroquia Luz de América; Se utilizaron 16 UBA específicamente ganado lechero para la recuperación de ovocitos. Los protocolos se dividieron en Fertilización corta sometiendo a una incubación de 5 horas y, Fertilización larga sometidas a una incubación de 18-20 horas; luego se realizó la evaluación del clivaje de los embriones. En el estudio se empleó prueba de T-student, determinando que existe diferencia entre ambos protocolos ya que presentaron cigotos viables de estado 6 (blastocisto), calidad 1 (excelente) dando el 47% para Fiv Larga y el 40% para Fiv corta, De acuerdo al análisis de costo beneficio de esta investigación se obtuvo un valor de 2,76 dolares para Fiv larga y 2,23 para Fiv corta Concluyendo que la utilización del protocolo de MIV para la obtención de embriones viables evidenció que existe una diferencia significativa para ambos tratamientos.

Palabras claves:

- **CLIVAJE**
- **OPU**
- **RECUPERACION**
- **MIV**

ABSTRAC

The objective of this research work was to evaluate two in vitro fertilization protocols in the cleavage of oocytes obtained by OPU, the different protocols were analyzed using the short and long FIV method, and the number of viable embryos was quantified. The study was carried out in the Animal Biotechnology laboratory of the University of the Armed Forces ESPE located in the province of Santo Domingo de los Tsáchilas, Parroquia Luz de América, 16 UBAs were used specifically dairy cattle for the recovery of oocytes, which were divided according to the protocols of Short Fertilization subjecting to an incubation of 5 hours and Long Fertilization subject to an incubation of 18-20 hours and the evaluation of the cleavage of the embryos. In the study, a student's T test was used, determining that there is a difference between both protocols since they presented viable zygotes of stage 6 (blastocyst), quality 1 (excellent), giving 47% for Long IVF and 40% for short IVF. According to the cost-benefit analysis of this research, a value of 2.76 dollars was obtained for long IVF and 2.23 for short IVF. Concluding that the use of the IVM protocol to obtain viable embryos showed that there is a significant difference for both treatments.

Key words:

- **CLEAVAJE**
- **OPU**
- **RECOVERY**
- **IVM**

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La reproducción natural constituye una de las funciones íntimamente ligadas al concepto del ser vivo; desde el punto de vista biológico, es necesario para perpetuar las especies a través del tiempo, conservando características fenotípicas y genotípicas de los progenitores; sin embargo la reproducción asistida con ayuda de la biotecnología ha generado nuevas alternativas; una de ellas es la FIV (fecundación in vitro) en la que se ha generado gran interés a nivel mundial a fin de aplicarlos en sistemas de producción para aumentar la productividad en la empresa; contribuye a mejorar el manejo de la natalidad animal dentro del hato ganadero, tanto en países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo. Desde 1982, cuando nació el primer ternero como resultado de la fertilización in vitro (FIV), la biotecnología ha evolucionado y permitido la producción masiva de embriones a un costo menor que el de los métodos establecidos, obteniendo ternero con un peso promedio de 45 a 50 kg de nacimiento (Salamone, 2017).

En el país el desarrollo tecnológico en reproducción animal no ha tenido el impacto que en otros países, solo del 3 a 4% de los productores de bovinos aplican el conjunto de biotecnología reproductiva para el desarrollo de su hato. En Santo Domingo de los Tsáchilas la FIV es una técnica relativamente nueva; en 2017 se inauguró la central genética de la Asociación de Ganaderos (Asogan) encargada de la transferencia de tecnologías en la zona (LA HORA, 2017), al llevar poco tiempo en funcionamiento es un proyecto reciente para la provincia, en la que dicha investigación planea contribuir con el desarrollo y mejora de dicha tecnología.

La aplicación de FIV en sistemas de producción presenta una probabilidad de preñez mayor que la inseminación artificial y la súper-ovulación minimizando los fracasos en la reproducción dentro del hato, permitiendo acortar tiempos para la obtención de nuevas crías, de tal manera que aumenta el rendimiento y la optimización del uso de semen de alto valor genético e incluso el aprovechamiento de hembras donantes que naturalmente no pueden reproducirse alargando su tiempo de vida reproductiva, en general aumenta el número de crías obtenidos en la ganadería, utilizando las mejores características de los progenitores para garantizar una progenie elite con cualidades fenotípicas, genotípicas y libres de enfermedades deseadas según las necesidades de la empresa ganadera, dando valor agregado a las crías obtenidas a través de esta técnica, generando mayores beneficios económicos al productor (Castillo, 2004), en la que se pretende aumentar la eficiencia y eficacia de concepción en la zona de Santo domingo de los Tsáchilas y generar confianza para incentivar la inversión de los productores en la FIV, dentro de su hato ganadero.

En la actualidad, el desconocimiento de las herramientas biotecnológicas reproductivas, han llevado a que los productores sufran un gran impacto a nivel económico por fracasos en la reproducción, atribuidos a una ineficiencia en el manejo del hato, especialmente por la proliferación de enfermedades que disminuye el número de crías por año, tanto que el decrecimiento de progenitores elite afecta a su estirpe, distanciando la brecha generacional y una progenie con características fenotípicas y genotípicas indeseables; a esto el desperdicio de tiempo para llegar a una nueva concepción, así como a un derroche de recursos naturales y no naturales disminuyendo la eficacia y eficiencia de la empresa ganadera. Hoy en día los productores locales presentan cierta resistencia a la aplicación de la FIV en su hato ganadero, como mecanismo para el mejoramiento genético, por la inversión que representa inicialmente y que no se cuantifica el aporte que presenta estas biotecnologías en el mejoramiento genético bovino (Alejandra, 2018).

En esta investigación se evaluó dos protocolos de fecundación in vitro (corta y larga) en clivaje de ovocitos obtenidos por OPU, de igual manera se valoró la capacitación de gametos masculinos y femeninos en la aplicación de los protocolos de FIV para la obtención de embriones de calidad; además se cuantificó el número de embriones viables de acuerdo al método de FIV corta y larga para determinar el procedimiento de mayor eficiencia y, se realizó un análisis del costo/beneficio, para establecer el tratamiento con mejores resultados económicos

CAPITULO II.

REVISIÓN DE LITERATURA

Procesos de maduración de ovocitos

Cuando el folículo primordial es liberado comienza el crecimiento junto al ovocito donde las células internas del cúmulo cooperan activamente para lograr el crecimiento de ovocitos ya que establecen contacto estrecho con la membrana celular de éste, durante la formación de la membrana externa del ovocito se forma la prolongación celular del montículo ovárico. La maduración del ovocito comprende de un periodo de crecimiento y un periodo final de preparación nuclear (Hafez, 2002).

Estructuralmente el ovocito maduro mide entre 110 – 115 micras y está rodeado de una membrana llamada oolema la cual contiene el citoplasma, donde se encuentra las organelas citoplasmáticas y el núcleo; este conjunto que los rodea se denomina zona pelúcida y tiene un grosor de 15 - 20 micras, el conjunto ovocito y zona pelúcida mide aproximadamente 150 micras, entre la oolema y la zona pelúcida está el espacio pre vitelino el que se encuentra en el corpúsculo polar, el cual indica que la maduración nuclear finalizó (S.E.F., 2002).

Maduración in vivo

La maduración de estos ovocitos es un fenómeno complejo que progresa desde el estadio de profase de la meiosis I hasta la meiosis II denominándose maduración nuclear, cuando el ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de LH o bien cuando es retirado el folículo, es necesario esperar un periodo de 24 horas para la maduración nuclear y maduración citoplasmática del ovocito en el que permanece hasta ser fertilizado (Vargar, 2018).

Maduración in vitro

Este proceso de maduración nos brinda la posibilidad de incrementar el conocimiento fisiológico y biotecnológico, la que permite la obtención de crías hembras con alto valor genético

La maduración in vitro es una serie de procesos que consiste en cultivar y madurar los ovocitos recolectados en estado de vesícula germinativa. (Mocha & Quezada, 2017) que la maduración tanto in vivo como in vitro, acontecen varios cambios bioquímicos y metabólicos que permiten la reanudación de la meiosis el cual ocurre luego de la descarga ovulatoria de LH, y se caracteriza por la expansión de las células del cúmulo, la eliminación del primer corpúsculo polar y progresión de la meiosis a metafase II.

Para llevar un buen control in vitro de ovocitos requiere el cumplimiento de los siguientes pasos: la recolección de ovarios en el matadero, obtención de ovocitos, selección de los ovocitos y maduración in vitro de los ovocitos (GARDÓN, 1999).

Método de transporte de ovocito en el oviducto

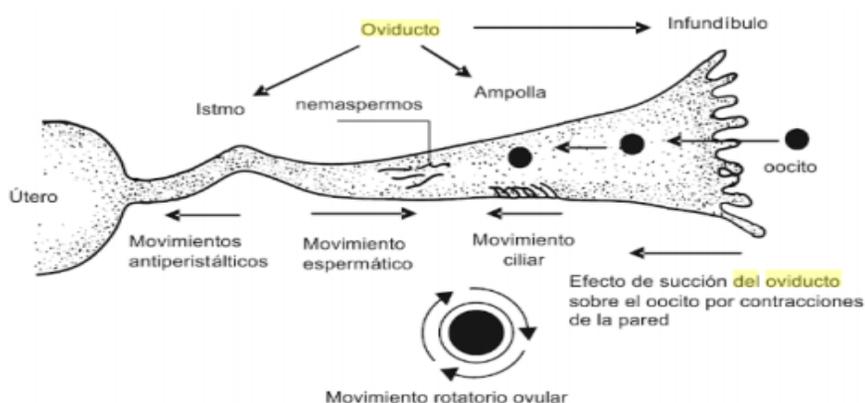
El oviducto presenta el microambiente adecuado para la captura, transporte y maduración final de los ovocitos ovulados; para el transporte, almacenamiento y capacitación de los espermatozoides y para las primeras divisiones del embrión (Handle, 2002).

En el momento de la ovulación el ovocito está rodeado del cumulus oophorus y una pequeña cantidad de fluido folicular viscoso, donde se ponen a disposición de la ampolla oviductal la cual transporta hacia la fecundación, en la unión ampular ístmica teniendo una duración de 24 a 30 minutos y posteriormente, los cigotos son transportados al utero.

(Handle, 2002) menciona que para el transporte de ovocitos contribuye las ondas de contracción peristálticas en el miosalpinx, durante la fase de transporte se produce una maduración final del ovocito secundario el cual puede preverse algún cambio en su membrana. La adhesión de glucoproteínas oviductales a la ZP es quizás uno de los cambios más importantes.

Figura 1.

Esquema del movimiento del ovocito en el oviducto del aparato reproductor femenino.



Nota: esquema del aparato reproductivo femenino y su función tomado de (Álvarez, Perez, & Sanches, 2009)

Método de obtención de ovocitos.

Los ovarios contienen gran número de folículos que se encuentran en diferentes estados de crecimiento, de la cual el animal solo utiliza una pequeña parte en su vida reproductiva. El objetivo de la recolección de ovocitos es recuperar y aprovechar los folículos no ovulatorios, los cuales se tornarían en folículos atrésicos por lo cual la recolección se puede realizar en dos formas (Ramírez & Jiménez, 2016):

Recolección de ovarios en animales vivos

La recolección de ovocitos proveniente de animales vivos, permiten incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora/año, además permite la disminución del intervalo generacional y establecer esquemas para incrementar la eficiencia de producción. La recuperación de ovocitos in vivo para la producción in vitro de embriones puede ser aplicada en todas las edades desde terneras hasta vacas adultas, en vacas secas, lactantes y aun preñadas después de los tres o cuatro meses de gestación sin interferir con el estado fisiológico de las donadoras y sin requerimiento de estimulación hormonal (GARDÓN, 1999).

Técnica de aspiración folicular.

En la actualidad la recuperación de ovocitos de hembras vivas por punción transvaginal guiada ecográficamente es muy factible, esta técnica permite obtener ovocitos de terneras de seis meses de edad y durante los tres meses de gestación y a partir de las dos a tres semanas de posparto. Además, la OPU-FIV permite obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad,; la viabilidad de estos ovocitos adquiridos por aspiración es similar al obtenido por lavado (Peláez, 2011).

Los pasos para la aspiración folicular se pueden resumir de la siguiente manera:

- Precisa de tranquilización del animal; se llevará a cabo en animales en pie en cualquier tipo de manga.
- Posteriormente se aplica anestesia vía epidural para reducir los movimientos internos y facilitar la manipulación del ovario.
- Vaciamiento del recto, limpieza y desinfección de la vulva y área perineal.
- Se introduce el transductor en la vagina convenientemente lubricado y protegido por una cubierta sanitaria de látex.
- Los ovarios se implantan vía rectal llevándolos hasta la pared vaginal (formix), para realizar contacto con la línea de bioxía se punza con aguja N° 18, de 2-3 mm.; Antes de iniciar la sesión de punción se drena una pequeña cantidad de este medio, tras la aspiración de tres a cuatro folículos se realizará un lavado del fluido en la aguja de aspiración y en el sistema de recolección con medio de lavado, recogida y suero fetal bovino.
- El fluido obtenido en tubo recogido de 50 ml será inmediatamente filtrado por continuos lavados de PBS fresco y se separa en una placa Petri para localizar y evaluar morfológicamente los complejos cúmulus ovocitos

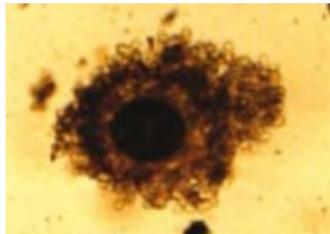
Para realizar esta técnica es importante disponer de estos tres dispositivos; un equipo de ultrasónico, una bomba de aspiración y un sistema de guía de aguja conectado a un tubo colector (Peláez, 2011).

Clasificación de ovocitos

La selección de ovocitos se realiza en base a tres criterios: el diámetro del ovocitos, el aspecto de su citoplasma y la característica del cúmulo que los rodea (Gonzaga., 2012). Además, se podrá clasificar en cinco categorías que son:

Figura 2.

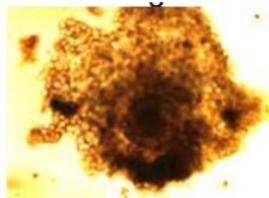
Categoría de ovocito grado I.



Nota: Ovocitos con más de tres capas de células de cúmulo compactas con citoplasma homogéneo uniformemente granulado tomado de (FAUBA, 2017).

Figura 3.

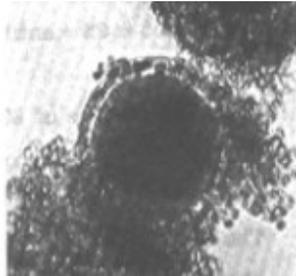
Categoría ovocito grado II.



Nota: Ovocito con menos de tres capas de células del cúmulo y citoplasma generalmente homogéneo tomado de (FAUBA, 2017).

Figura 4.

Categoría de ovocito grado III



Nota: Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con área oscura. Tomado de (FAUBA, 2017)

Figura 5.

Categoría de ovocito grado IV



Nota: Ovocitos desnudos tomado de (FAUBA, 2017)

Maduración de ovocitos

La maduración in vitro de los ovocitos se da hasta alcanzar la metafase II, esta maduración puede alcanzar entre 20 y 28 horas. En este intervalo el ovocito sufre una serie de cambios como la desaparición de la membrana nuclear, la extrusión del primer corpúsculo polar y la llegada al estadio de metafase II (GARDÓN, 1999). (FAUBA, 2017) menciona que se colocan grupos de 20 a 22 ovocitos en gotas de 100µl de un medio de maduración el cual permanece durante un periodo de 21 a 22 horas en una incubadora con 6% de CO₂ y 100% de humedad a 39°C (Recillas & Quintero, 2013).

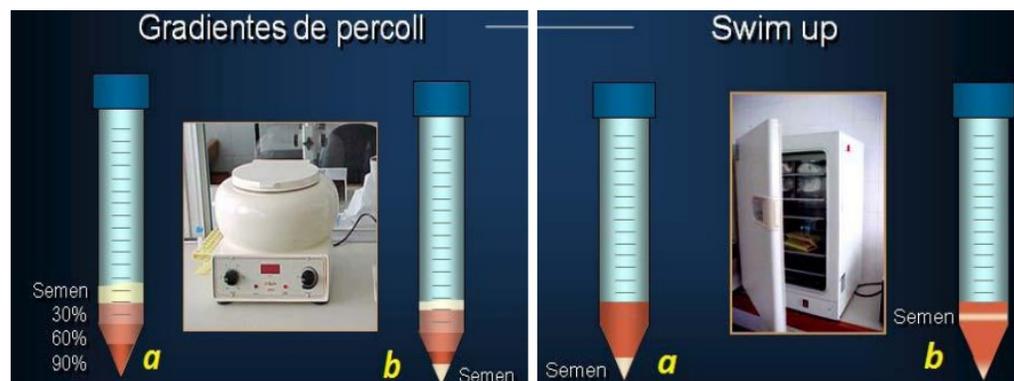
Procesos de fecundación

Es vital importancia tener protocolos y metodologías para este sistema de fecundación in vitro, una vez obtenido el ovocito viable esta fase de fecundación cuenta con dos pasos: seleccionar los espermatozoides más viables eliminando los muertos y de baja viabilidad ya que durante su capacitación sufren series de fenómenos que lo conduce a la hiperactivación y reacción acrosómica proceso vital para la entrada espermática a la zona pelúcida y posteriormente la fertilización, por ello se ha utilizado los métodos de tratamiento espermático como swim up y swim down (Recillas & Quintero, 2013).

Una alternativa es la separación swim up permite recuperar los espermatozoides con mejor motilidad y la posterior incubación de estos con heparina y la otra es la separación espermática es el gradiente de percoll que es equivalente a un swim Down, el cual recupera del fondo del tubo los espermatozoides más motiles (Cabezas, Universidad Nacional Agraria La Molina, 2017).

Figura 6.

Protocolos para capacitación para semen bovino.



a. Semen adicionado sobre la columna de gradientes de percoll en tubos

b. Posición de los espermatozoides motiles, luego de centrifugación por 10min.

a. Semen adicionado por sotoposición a 1ml de medio de capacitación en tubos

b. Posición de los espermatozoides motiles, luego de la incubación por 1 hora de estufa.

Nota: esta figura muestra los métodos a seguir para la capacitación del semen bovino tomado de (Cabezas, 2017).

Clivaje de ovocitos.

El desarrollo celular se puede evaluar a las 48 horas post-fertilización para determinar el número de óvulos fertilizados ya que se pueden clasificar de acuerdo a la presencia de fragmentación, blastómeros y velocidad de clivaje observado con microscopio invertido o con lupa estereoscópica, los embriones de mayor calidad son aquellas que tengan mayores blastómeros al día 2, posteriostemnte puede aplicarse la evaluación al día 5 que se esperará encontrar estado de mórula y así poder considerar el estadio del embrión (Villamil, 2013).

Clasificación ovocitaria

Según el estado de desarrollo del cigoto se clasifica de acuerdo a la siguiente tabla:

(Janke, 2015):

Tabla 1.

Estado de Desarrollo embrionario

Nº	Estado
1	No fecundado
2	2 a 12 Células
3	Mórula temprana
4	Mórula
5	Blastocisto temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto expandido
8	Blastocisto eclosionado
9	Blastocisto eclosionado expandido

Nota: Nota: esta tabla muestra los códigos de estado para el clivaje de embriones.

Calidad embrionaria

Para la clasificación de embriones se clasifica de acuerdo a la siguiente tabla por (Janke, 2015):

Tabla 2.

Calidad de los embriones según su morfología.

Código	Calidad
Código 1	Excelente o Bueno
Código 2	Regular
Código 3	Malo
Código 4	Muerto o Degenerado

Nota: esta tabla muestra los códigos de calidad para el clivaje de embriones.

Factores que afectan al ovocito.

Existen varios factores que influyen tanto en la cantidad como en la calidad, esto se puede estimar inmediatamente por la competencia de los ovocitos, pero existen características que solo se pueden apreciar en la fertilización in vitro (Ulloa., 2017).

Edad del animal

Al obtener ovocitos de animales muy jóvenes o muy viejos no todos se comportan de la misma manera al momento de la maduración in vitro, ya que ovocitos obtenidos de terneras requieren una mayor atención en cuanto a sustratos empleados para su maduración, los ovocitos recolectados de hembras pre-púberes resultan ser menos competentes que su contraparte adulta ya que la tasa de viabilidad de los ovocitos son bajas comparadas a las de mayor edad, esto se nota ya que los ovocitos son más pequeños en diámetro, y prestan baja tasa metabólica (HILARIO, 2018).

Así mismo la edad adulta a partir de los 13 años está relacionada con el descenso de la fertilidad, esto disminuye la tasa de fertilización y clivaje el cual está relacionado con los cambios endocrinos y foliculares ya que se reclutan folículos menores a 4 - 5 mm por onda folicular y el número aproximado de folículos pre-antrales para una vaquilla es de 109,000 y para una vaca es de 89,000 disminuyendo con el paso de los años (HILARIO, 2018).

Categorías de los animales

Existe una variabilidad notoria el cual se da en vacas de carne y leche, esto influye en la recuperación de los ovocitos, la raza Bos Indicus genera un número mayor de ondas foliculares dando una mejor población folicular que la raza Bos Taurus (Moro, 2014).

(RODERO, 2016) manifiesta que vacas de alta calidad genética producen ovocitos de más baja calidad que las vacas con menor calidad genética.

Ciclo estral

Estudios han demostrado que la fase del ciclo estral tiene gran influencia en el desarrollo y la producción in vitro de embriones, con donadoras que se encuentren en los 14 - 16 días cuando los ovarios se encuentra en la fase lútea se obtienen ovocitos de muy buena calidad (HILARIO, 2018).

Tamaño de ovarios.

HILARIO, (2018) que el tamaño y el peso de los ovarios está estrechamente relacionado a la edad y número de ovocitos, en vacas adultas tiene un 60% de ovarios pequeños, 80% de folículos y ovocitos menos saludables y 45% menos de folículos y ovarios saludables por gramo de ovario.

Condición nutricional y medioambiental

Un exceso o deficiencia de nutrientes, el mal suministro de materia seca, la alimentación adecuada en el periodo de transición se ve afectado directamente a los ovocitos (HILARIO, 2018).

El desarrollo de los ovocitos son sensibles a la temperatura, además el estrés calórico tiene una influencia directa en el performance productivo y reproductiva de los bovinos, se ha determinado que en el trópico la calidad de los ovocitos disminuye en vacas de origen europeo comparadas con los de origen indico (RODERO, 2016).

CAPITULO III

MÉTODOS Y MATERIALES

Ubicación del área de investigación.

Ubicación política.

- País: Ecuador
- Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas
- Cantón: Santo Domingo de los Colorados

Ubicación ecológica.

- Altitud 625 msnm
- Temperatura 24-27 °C
- Precipitación 2800 mm/año
- Humedad relativa 85 %
- Eliofofania: 680 h/luz/año

Ubicación geográfica.

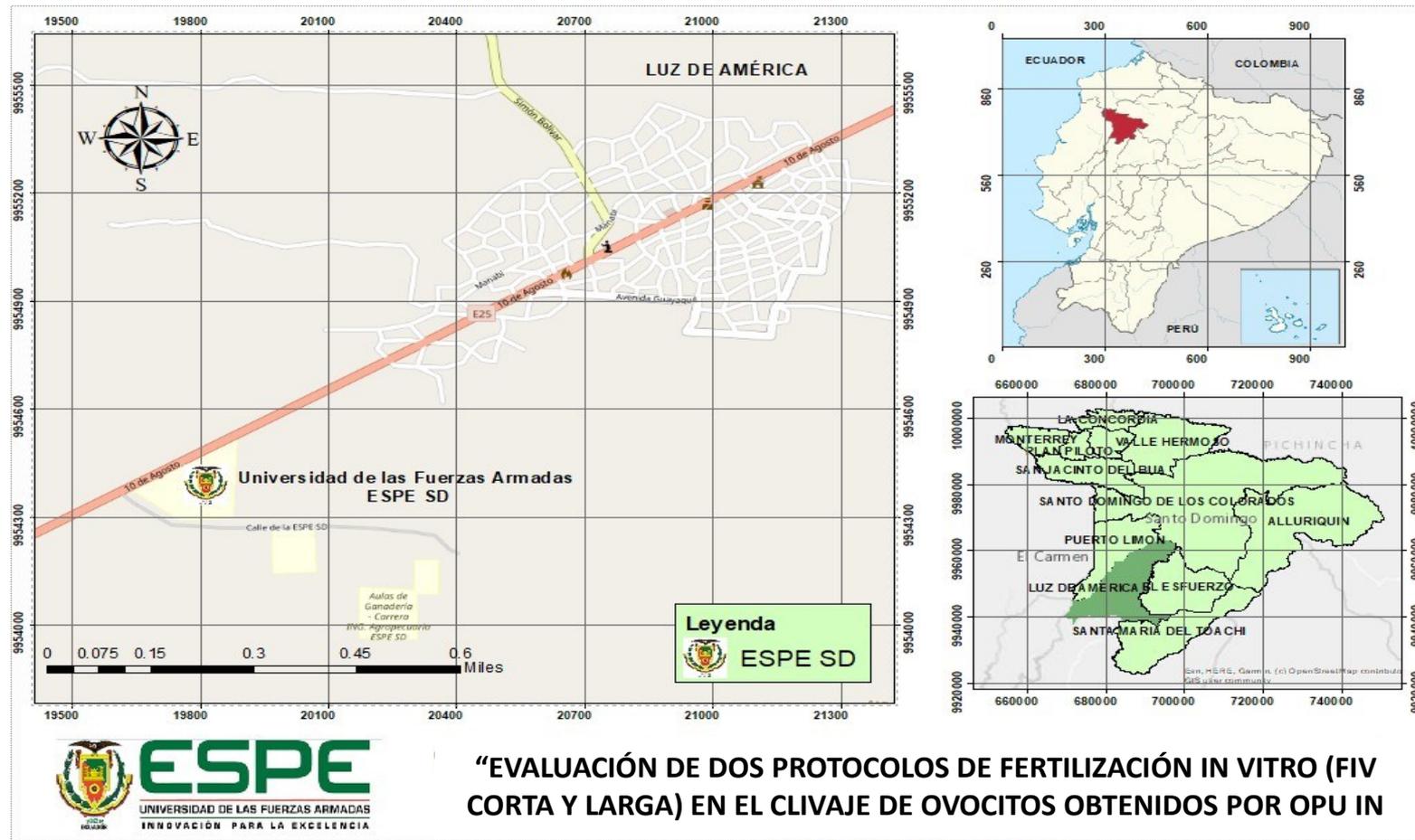
El presente proyecto se desarrolló en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Hacienda Zoila Luz en el km 24 vía Quevedo en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. Laboratorio de Biotecnología Animal.

Coordenadas X: 688149 UTM

Coordenadas Y: 9954652 UTM

Figura 7.

Ubicación geográfica del proyecto de investigación



Nota: la figura representa el croquis de la zona de estudio.

Materiales.

Biológico.

- Ovocitos
- Espermatozoide

Medios de cultivo.

- Medio de maduración TCM
- Medio de fertilización,
- Medio de desarrollo.
- Suero PBS
- Antibióticos (penicilina y estreptomicina)
- Piruvato de sodio
- Cisteamina
- FSH
- Percol
- Agua destilada
- Roscovatina
- TALP-Hepes

Equipos.

- Balanza analítica
- Incubadora
- Lupa (10-20X a 40-50X)
- Centrífuga
- Cámara de Neubauer o Thoma y cubreobjetos
- Freezer
- Heladera
- Microscopio óptico
- Estufa a 38 °C
- Micro pipetas (al menos tres medidas, 20, 200 y 1000 μ l)
- pH metro o indicador de pH
- Platina térmica con extensión a lupa
- Baño María de Stover

Métodos

Para el presente proyecto se utilizó 16 UBA del área de ganadería de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" de diferentes razas específicamente ganado lechero con buenos méritos genéticos, para la extracción de ovocitos se trabajó con tres cesiones por animal, es decir 4 donantes por día durante 4 días, donde el número de ovocitos se distribuyó equitativamente a FIV larga y a FIV corta.

Preparación de medios

Para las fórmulas de los medios se obtuvo de (FAUBA, 2017)

Tabla 3.

Medios de maduración in Vitro

Medio de cultivo	Cantidad	Unidad de Medida
TCM	0,19	gr
SFB	1	ml
Piruvato de sodio1nM	10	ul
FSH	2	ul
Antibiótico antimicótico	100	ul
Volumen total	20	ml

Nota: esta tabla muestra la cantidad y pesos a utilizar para el medio de cultivo.

Tabla 4.*Medio de Cultivo de Embriones SOF (fluido del sistema oviductal)*

Medio de cultivo de embriones SOF	Cantidad	Unidad
Volumen total	50	ml
NaCl	314,65	mg
KCl	26,7	mg
CaCl ₂ H ₂ O	12,39	mg
KH ₂ PO ₄	8,1	mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	9,1	mg
Na HCO ₃	105,48	mg
Rojo fenol	50	ul
Na piruvato	18,15	mg
Na Lactato	72	ul
BDS – FAF	400	mg
BME	100	ul
MEM	50	ul
Na trici	5	mg
Mio Inositol	25	mg
SFB	2,5	%v/v
ATB/ATM	500	ul

Medio de cultivo de embriones SOF	Cantidad	Unidad
H ₂ O	55	ml
pH	7,2 – 7.4	

Nota: esta tabla muestra la cantidad de productos para los medios a utilizar, el medio SOF se pasa por filtro de 0,22micras y se conserva en nevera hasta 30 días.

Tabla 5.*Medio TALP-Hepes (holding)*

Medio TALP-Hepes	Cantidad	Unidad
H ₂ O	445	ml
NaCl	3,331	gr
KCL	0,1195	gr
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,147	gr
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,051	gr
ATB/ATM	5	ml
Rojo fenol	0,5	ml
Na Lactato	0,72	ml
Na piruvato	0,5	ml
NaHCO ₃	0,084	gr
Hepes	1,19	gr
BSA	1,5	gr
Osmolaridad	275 +/-10mOsm/kg	
pH	7,2 – 7,4	

Nota: esta tabla muestra la cantidad y peso de cada producto a utilizar para los medios de cultivo de FIV

Tabla 6.

Medio de Cultivo para FIV corta y larga.

Solución A		Solución B		BO	
NaCl	0,4309 gr	NaHCO ₃	0,1940 gr	Sol. A	11,4 ml
KCl	0,0197 gr	Rojo fenol	3 ul	Sol. B	3,6 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0217 gr			Piruvato Na	0,00206 gr
NaH ₂ O	0,0084 gr		Penicilina/estreptomicina		0,3 ml
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,0069 gr				
Rojofenol	10 ul				
Volumen total	50ml	Volumen total	15 ml	Volumen total	15 ml

Nota: esta tabla muestra detalladamente la cantidad de productos y sus pesos para los medios a utilizar

Tabla 7.

SDS (diluyente de semen) y SWS (solución para lavado de semen)

Medio SDS	Cantidad	Medio SWS	Cantidad
Sol. BO	5 ml	Sol BO	10 ml
BSA	100 mg	Cafeína	40 mg
		Heparina	10 ul

Nota: esta tabla muestra la cantidad de productos para los medios a utilizar, estas soluciones solo se pueden conservar hasta 15 días.

Manejo de reproductoras

Se procedió a seleccionar 16 reproductoras con alto valor genético, para la punción folicular se las preparó con dos meses de anticipación, se aplicó Doramectina para controlar parásitos internos y externos, además sal mineral, balanceado y minerales inyectables (20ml/3días) con la finalidad de estimular y aumentar el desarrollo folicular.

Cada donante, al cuarto día de la aplicación de minerales inyectables se aplicó el dispositivo intravaginal el cual contiene 1.39 gr de progesterona, benzoato de estradiol 1,5ml y prostaglandina F2 alfa 2 ml.

Obtención de ovocitos

Previo a la punción folicular (OPU), el área de trabajo debe estar limpio para poder ingresar a las reproductoras; una vez en la manga o jaula se limpia la zona pélvica; se procede a evacuar las fecas para volver a lavar y desinfectar la vulva y región perianal, para inyectar lidocaína vía epidural (Gómez, 2006).

Se calibra el equipo OPU y se protege con una cubierta látex; la aspiración folicular se efectuó utilizando la técnica recto vaginal, el cual se maneja con la mano derecha la sonda y la mano izquierda la sujeción del ovario; visualizando en el ecógrafo el ovario se posiciona el ovario delante de la sonda y se realiza la punción de todos los folículos entre los seis milímetros con una presión de 75 – 80 mm Hg con aguja (20g 0`9 x 70mm) conectado por medio de la vía guiado al tubo falcón de 50 ml con 15 ml de PBS + heparina (suero fetal bovino) a temperatura de 37,7 a 37,8°C (Gómez, 2006).

Una vez obtenido el líquido folicular y terminada la aspiración folicular transvaginal el tubo falcón se guarda en la bomba de vacío el cual mantiene la temperatura a 37,8°C para luego realizar el filtrado del residuo de sangre con suero fetal bobino en un filtro de OPU, una vez eliminado se procede a pasar a la placa Petri de búsqueda temprana (Gómez, 2006).

Búsqueda y selección de ovocitos

El sedimento producto del lavado de los cuernos uterinos se deposita en cajas Petri cuadrada de búsqueda temprana con 2ml de medio TALP-H a 37,8 °C en planta térmica; se deja sedimentar durante dos minutos, con ayuda del estereoscopio se buscó cuadrante por cuadrante seleccionando únicamente los ovocitos de grado uno y dos ya que estos presentan mayor compactibilidad de las células del cúmulo para luego pasar al sistema de producción in vitro de embriones el cual se divide en tres procesos: Maduración de ovocitos, Fecundación de ovocitos y Cultivo de embriones (RODERO, 2016).

Maduración in vitro de ovocitos

Los ovocitos recolectados son colocados en una caja Petri cuadrada con 3 ml de TALP-H para someter al primer proceso de lavado y así eliminar el fluido folicular (Gonzaga., 2012).

El medio de maduración se coloca en una caja Petri de 30 mm con cuatro micro gotas de 100 ul, luego se recube completamente con aceite mineral para evitar la fricción y reducción de pérdida del medio de maduración; cada placa se lleva a aclimatación en la incubadora de CO₂ por 20 minutos antes de la distribución de los ovocitos en cada gota. La capacidad de cada micro gota es de 15 a 25 ovocitos y luego llevados a incubación durante 18 a 20 horas a 37 °C; 94% humedad y 6% CO₂ (FAUBA, 2017).

Métodos de separación de espermatozoides móviles

Una vez pasadas las horas de la maduración y previa a la fecundación se prepara las diluciones para las gradientes de lavado espermático o gradientes de percoll a 30-60-90% y en tubos effendor la preparación de 3.5 ml de SDS/SWS y colocar en la incubadora de CO₂ por 20 minutos (FAUBA, 2017).

Luego se prepara las gradientes de percoll en un tubo falcón de 15ml con 400 µl de cada una de las soluciones; se coloca en orden por sotoposición 90-60-30% con mucho cuidado (RODERO, 2016).

Proceso de fecundación in vitro

Este proceso se realizó mediante la descongelación de cada dosis de semen en baño maría a 37°C durante 30 segundos, luego se efectúa un corte en la punta de la pajilla con ángulo de 45 grados y descargando el semen en la superficie del tubo que contienen las gradientes de percoll y se lleva a centrifuga durante 10 minutos por 800g (Peláez, 2011).

Transcurrido el tiempo, se tomó 250 µl del pellet del fondo, el cual contiene los espermatozoides vivos y colocarlos en el tubo falcón contenido por SDS/SWS en partes iguales y llevarlos a centrifuga por 10 minutos a 400g, a continuación, se ajusta la concentración de espermatozoides a 1 millón/ml, utilizando la cámara de Neubauer para recuento de células, colocando 10µl de esta dilución de semen en 990 µl de agua destilada, luego de homogenizar se toma esta dilución y se coloca en la cámara y con el microscopio se contabilizan las células espermáticas; en caso que se pase esta concentración se debe diluir con solución SWS/SDS calibrados (Recillas & Quintero, 2013).

Posteriormente se hacen gotas de 100 μ l y se cubren con aceite mineral. A continuación, los ovocitos se lavan en TALP-H para eliminar el suero que viene del medio de maduración y se separan en grupos de 20 a 25 ovocitos por gota. Estas gametas se co-incuban a su vez de 18 a 20 horas (FAUBA, 2017).

FIV corta sin separación espermática

Este proceso se realiza con la descongelación de la dosis de semen del mismo método de FIV, el contenido se descarga en tubos de 15 ml con 5 ml de solución para lavado de semen, suplementado con heparina 2 μ g/ml; se centrifuga por 10 min a 500 g, se desecha el sobrante y se repite dos veces, el pellet obtenido se re suspende en SWS y en dilución de semen en cantidades iguales, la concentración final se ajusta a 16 millones/ml adicionando SWS/SDS, con una dilución final de 100 μ l y se cubre en aceite mineral previamente calibrado en incubadora gaseosa. En seguida los ovocitos se lavan en TALP-H para eliminar el suero que viene del medio de maduración y se separan en grupos de 20 a 25 en las gotas. Estas gametas se co-incuban en el medio definido como Brackett o BO en incubadora gaseosa durante 5 horas (FAUBA, 2017).

Enjuague de los ovocitos

Una vez terminado la fase de fecundación, son sometidos al desnudado o eliminación del Cúmulo, se coloca en tubo de 1,5 ml con 100 μ l de solución de Hialuronidasa 1 mg/ml en TALP-H, se los centrifuga en el vortex por un minuto y posteriormente se procede a verter el contenido en una placa Petri de 35mm. Los ovocitos desnudos colectados son pasados a una nueva placa destinadas al cultivo in vitro (FAUBA, 2017).

Cultivo in vitro

Al término de las horas de fecundación larga y corta y el lavado de los ovocitos son pasados a cajas petris con gotas de 80 µl con medio SOF y totalmente cubiertas de aceite mineral, en cada gota se agregó de 20 a 25 embrioncitos y colocados a incubadora de CO₂ durante 7 días (FAUBA, 2017).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico a evaluar en ambos protocolos (FIV corta y FIV larga), se considera el método de t-student al 5%, pues existen dos únicas variables a medir y, los resultados se presentarán en gráficos.

Media

$$x = \frac{\sum x_i}{n}$$

Desviación estándar

$$Sd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1} (x - \chi)^2}{n - 1}}$$

Estadístico de prueba

$$t = \frac{x_d}{\frac{Sd}{\sqrt{n}}}$$

Determinación económica

La comparación de costos en los métodos aplicados para aspiración folicular, se determinó con la metodología de relación Costo-Beneficio.

Formula: DE= Beneficio – Costo

Variables de estudio.**Número de ovocitos recolectados.**

Se contabilizó los números de ovocitos obtenidos mediante OPU en animales in vivo

Número de ovocitos aptos para la incubación.

Se estableció la calidad de los ovocitos aptos para la incubación mediante la observación bajo microscopio, clasificándolos por grados, tanto la primera como la segunda, según la cantidad y calidad de capaz de células de la granulosa

Porcentaje de maduración in vitro.

Se contabilizó el porcentaje de maduración in vitro de los ovocitos, cuyo objetivo es el de obtener los mejores resultados en la fecundación

Porcentaje de fertilización in vitro.

Se calculó el porcentaje de fertilización in vitro de los ovocitos, con el fin de obtener la mayor cantidad de embriones.

Porcentaje de embriones viables.

Se calculó el porcentaje de embriones in vitro con el fin de obtener una correcta transferencia de los mismos.

CAPITULO IV

RESULTADOS

Número de ovocitos recuperados

Tabla 8.

Número de ovocitos recuperados posterior a los protocolos de superovulacion.

		Buenos	Intermedios	Malos
		(A)	(B)	(C)
FIV corta	No. COCs	47	61	84
	%	24,5	31,8	43,8
FIV larga	No. COCs	53	63	82
	%	26,8	31,8	41,4
Total	No. COCs	100	124	166
	%	25,6	31,8	42,6

Nota: Nota: esta tabla muestra el número y porcentaje de ovocitos recuperados en los dos protocolos de OPU

En la recuperación ovocitaria según la tabla 8, la prueba de t student determina que existe diferencia significativa entre los protocolos, en el cual el número de ovocitos recuperados en FIV larga son 198 consiguiendo el 26,8 % de calidad buena, 31,8% de calidad intermedia y el 41,4% de mala calidad, mientras que en la FIV corta son 24,50% de buena calidad, 31,8% de calidad intermedia y 43,8% de mala calidad.

Maduración de los ovocitos**Tabla 9.***Número de ovocitos maduros para los protocolos de FIV.*

		Maduración	Inmaduros	Total
FIV corta	No. COCs	43	4	47
	%	91,5	8,5	100
FIV larga	No. COCs	51	2	53
	%	96,2	3,8	100
Total	No. COCs	94	6	100
	%	94	6	100

Nota: esta tabla muestra el número y porcentaje de ovocitos maduros en los dos protocolos de MIV.

Observando la tabla 9. Según el p-valor con un nivel de significancia del 5% obtenida en la prueba de T, se considera la hipótesis alternativa en el que uno de los tratamientos influye en el periodo de maduración. En el protocolo de FIV larga 53 ovocitos fueron evaluados en fase de maduración, de los cuales el 96,2% corresponde al porcentaje de células maduras con una pérdida por degeneración de 3,8% mientras que el protocolo de FIV corta, la tasa de maduración es inferior respecto al FIVL debido a que de los 47 ovocitos sometidos, el 91,5% llegaron a una expansión adecuada de células (células maduras), con pérdida de gametos del 8,5% , independientemente a los protocolos el porcentaje global de maduración fue de 94% de COCs maduros y 6% de COCs perdidos.

Fecundación de los ovocitos**Tabla 10.***Número de ovocitos fecundados*

		Fecundados	No fecundados	Total
FIV corta	No. COCs	30	13	43
	%	68,97	31,05	100
FIV larga	No. COCs	47	4	51
	%	92,08	7,92	100
Total	No. COCs	77	17	94
	%	81,91	18,09	100

Nota: esta tabla muestra el número y porcentaje de ovocitos fecundados en los dos protocolos de FIV corta y larga.

Tabla 10. Según el p -valor obtenido por la prueba de T, se admite la hipótesis alternativa, que al menos uno de los tratamientos incide en el protocolo de fecundación in vitro, de tal manera que la FIV larga presenta una mayor capacidad de COCs fecundados con 92,08% , a diferencia de la FIV corta con 68,97%; dando un global de 81,94% de COCs fecundados y 18,09% de no fecundados.

Número de embriones viables**Tabla 11.**

Número de embriones viables obtenido en los protocolos de FIV.

		Cigoto	Perdida	Total
FIV corta	No. COCs	25	5	30
	%	83,33	16,67	100
FIV larga	No. COCs	35	12	47
	%	74,47	25,53	100
Total	No. COCs	77,9	22,1	100
	%	81,91	18,09	100

Nota: esta tabla muestra el número y porcentaje de embriones viables obtenidos en los dos protocolos de FIV corta y larga.

En la tabla 11. Se puede observar que el p-valor demuestra que hay diferencia significativa por lo que se acepta la hipótesis alternativa que al menos uno de los tratamientos incide en el protocolo de fecundación in vitro ya que existe un 83,33% de cigotos viables con pérdidas de 16,67% para la FIV corta, mientras que para FIV larga la tasa de embriones viables es de 74,47% con una pérdida de 25,53% , independientemente a los protocolos, que el porcentaje global de embriones viables fue de 77,9% de cigotos viables con una pérdida del 22,1%.

Calidad de los ovocitos**Tabla 12.***Calidad de los ovocitos en los protocolos.*

Código de calidad y estado	FIV corto	FIV largo	Total
C. de estado 2	2	2	4
C. de calidad 2	6,7	4,3	5,2
C. de estado 2	17	6	7
C. de calidad 4	3,3	12,8	9,1
C. de estado 4	2	4	6
C. de calidad 3	6,7	85	7,8
C. de estado 4	10	6	16
C. de calidad 1	33,3	12,8	20,8
C. de estado 5	3	12	15
C. de calidad 1	10	25,5	19,5
C. de estado 6	12	17	29
C. de calidad 1	40	36,2	37,7
Total	30	47	77
%	100	100	100

Nota: esta tabla muestra la calidad y estado que se encuentra el resultado del clivaje de los embriones de FIV corta y larga.

Tabla 12. Se observa diferencia en los cigotos viables de acuerdo a la clasificación de calidad y grado, donde se obtuvo cigotos de grado 4 calidad 1 con un porcentaje de 33,3% para FIV corta y 12,8% para FIV larga, y cigotos viables de estado 6, calidad 1 para FIV corta con 40% y para FIV larga con 47%, es decir que los cigotos llegaron a estado de blastocisto. Además, se encontraron cigotos de calidad 4 que no progresaron en la división.

Análisis económico de los protocolos de FIV

Tabla 13.

Análisis económico de los métodos de Fertilización In Vitro

	Descripción	Cantidad	V/U	Total FIV corta	Total FIV larga
16 vacas lecheras	Minerales inyectables	2	20	40	40
	Sales minerales	3	22	66	66
	Lidocaína	2	7	14	14
	Balanceado	20	23	460	460
	Dosis de semen	5	8	40	40
	OPU materiales	2	75	150	150
	Equipo OPU	1	166,50	166,50	166,50
	Medios de producción (MIV, FIV, CIV)	3	300	900	900
	Utilización de laboratorio	1	100	100	100
	Percol	1	60		60
Total egreso				1936,50	1996,50
	Embriones producidos FIV corta	25	250	6250	
	Embriones producidos FIV larga	30	250		7500
Total ingreso				4313,50	5503,50
Utilidad neta				2377	3507
Costo/Beneficio				2,23	2,76

Nota: esta tabla muestra el costo beneficio que presenta la producción de embriones tanto FIV larga y corta.

En la tabla 13, podemos observar el análisis económico de los dos métodos de FIV, donde se evidencia que la diferencia de egresos es de 60 dólares, demostrando que el ingreso neto para FIV corta es de \$2377 y para FIV larga es \$3507; esta diferencia se genera por los embriones obtenidos después del protocolo de cada FIV; además los equipos de laboratorio tienen una depreciación de cinco años, resultando un costo beneficio para FIV corta de \$2,23 y para FIV larga 2,76.

CAPITULO V

DISCUSIONES

La recuperación ovocitaria posterior al protocolo de súper ovulación para los tratamientos de FIV, la media aritmética fue de 24 ovocitos obtenidos por OPU con estimulación ovárica. Según Gonzalez,(2013) los resultados obtenidos de OPU/FIV en el periodo de tres años, los animales con estimulación ovárica así mismo no estimulados presentaron un rango de 21 - 36 COCs, sin embargo la cantidad recolectada entre tratamientos fue diferente ya que en el presente estudio, las donantes de FIV larga se encontraban en reajo, mientras las donantes de FIV corta fueron sometidas a la cantidad de radiación solar que recibieron; esto altera de manera positiva o negativa a la reproducción, siendo éste un factor de estrés interviniendo en la duración y expresión del esto, desarrollando embriones tempranos, relaciones hormonales y crecimiento fetal. Estos resultados coinciden con aquellos mencionados por Torres, (1975), donde el desarrollo embrionario es altamente sensible a altas temperaturas, entre los primeros tres a 11 días después del servicio, además altera el desarrollo y dominancia folicular durante los primeros ocho días del ciclo estral repercutiendo en la cantidad y calidad ovocitaria.

En cuanto a la maduración ovocitaria ocurrida en un periodo de 18 a 22 horas sometidas al medio de maduración para los dos protocolos, tanto para FIV corta con 91,50% como en FIV larga con 96,20% es mayor a lo mencionado por Andrew Watson,(2000) que los COCs inmaduros permanecen en profase meiotica I en el interior de los folículos ováricos, pero cuando son removidos de estos y cultivados in vitro, retoman el proceso de meiosis y aproximadamente el 90% de ellos alcanzan la etapa de metafase II, sin embargo entre los protocolos presentaron diferencia significativa atribuidos a factores externos como el estrés calórico o incluso el diámetro de aguja e interacción de la bomba de vacío que causa una reducción de la calidad ovocitaria principalmente a la pérdida del cumulus oophorus repercutiendo a la cantidad de ovocitos maduros, según lo descrito por (Nunes & Graves, 2002) que algunos factores secretados por las células del cumulus tales como glicosaminoglicanos y hormonas esteroideas, intervienen en la maduración citoplasmática.

Respecto a la tasa de fertilización, fueron diferentes para FIV corta con 68,78% siendo mayor a la FIV larga con 92,08%; comparado con los resultados obtenidos por (Fernandez, 2007) con un 73,3% sin embargo en este estudio también realizan la comparación de oocitos según su morfología, dividiendo los oocitos en cuatro grupos según la presencia de células del cumulus oophorus donde los oocitos rodeados con seis capas presentó una tasa de fertilización de 81,9%. En cuanto a la FIV corta y la reducción en la fertilización frente a la FIV larga, se atribuye al periodo de fecundación en las que fueron sometidos; donde menciona (Lange, 2008) que una exposición de gametos en periodo reducido disminuye la tasa de fertilización y no mejora la calidad del embrión en comparación con un procedimiento de inseminación estándar de 18 horas, además es importante utilizar la cantidad óptima al momento de la incubación como lo menciona (Li, 2015) donde algunos metabolitos que son producidos por los espermatozoides y las células del cumulo, causan estrés oxidativo que se asocia a la peroxidación de macromoléculas como los lípidos y las proteínas de membrana, así como daño en el ADN

El clivaje está en función a la propia morfología del oocito siendo uno de los factores determinantes para la calidad de los cigotos viables los cuales son provenientes del protocolo de FIV corta con 15,63% mientras para la FIV larga con 17.67% , según lo mencionado por (Krisher, 2004), los ovocitos deben presentar un citoplasma homogéneo con granulaciones finas y completamente envueltos por varias capas de células de cumulus dispuesto en forma compacta.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Los elevados resultados de los índices de maduración y fertilización in vitro tanto larga y corta, demuestran que los protocolos y condiciones del cultivo en la presente investigación, son aptos para las necesidades y procesos fisiológicos que deben cumplir para un correcto desarrollo embrionario.

En cuanto a la capacitación de gametos tanto femeninos como masculinos desde el periodo de maduración y fertilización, existe diferencias significativas entre los protocolos, es decir la FIV larga obtuvo la tasa de fecundación estadísticamente superior frente al FIV corta, lo que significa que la diferencia de tiempo en los periodos de capacitación, repercute en la calidad y cantidad de los cigotos viables.

La utilización del protocolo de MIV para la obtención de embriones viables evidenció que existe una diferencia significativa para ambos tratamientos, influyendo en el beneficio económico de los protocolos, demostrando la efectividad de la aplicación de la FIV larga con un costo beneficio de 0.53 ctvs de cada dólar en comparación con la FIV corta.

RECOMENDACIONES

Para obtener una buena respuesta en la cantidad y calidad ovocitaria es recomendable mantener un manejo adecuado de las donantes, siendo prudente someterlas a un buen manejo por lo menos dos meses antes de la OPU.

El manejo adecuado de los equipos utilizados en el proceso de OPU, es importante principalmente en la estandarización de la bomba de vacío, cuya presión de mercurio debe ser regulada de acuerdo a la altitud de la operación de la OPU a igual que el diámetro de la aguja de punción.

La preparación de los medios de cultivo es un factor importante en todas las fases de la fertilización in vitro FIV, influye desde la higiene hasta el peso minucioso de las sales. A esto se agrega el mantenimiento de las normas de bioseguridad en el laboratorio en forma permanente.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAGIA

- Alejandra, V. (20 de Julio de 2018). *Universidad de cuenca*. Obtenido de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Álvarez, A., Perez, H., & Sanches, A. (2009). *Fisiologia animal aplicada*. Medellin: primera ed.
- Andrew Watson, P. S. (1 de Febrero de 2000). *Biologia de la Reproduccion*. Obtenido de Impact of Bovine Oocyte Maturation Media on Oocyte Transcript Levels, Blastocyst Development, Cell Number, and Apoptosis: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/62/2/355/2734633?login=true>
- Cabezas, R. C. (2017). *Universidad Nacional Agraria La Molina*. Obtenido de "EVALUACIÓN DE SOBREVIVENCIA POST DESCONGELACIÓN DE BLASTOCISTOS BOVINOS (in vitro) VITRIFICADOS EN DOS : <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3430/condori-cabezas-rosa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cabezas, R. C. (2017). *Univesidad Nacional Agraria la Molina*. Obtenido de Evaluacion de Sobrevivencia post descongelacion de blastocistos bovinos (in vitro) vitrificando en dos dispoctivos cerrados.
- Castillo, A. (12 de Octubre de 2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro*. Obtenido de <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- Estrella, C., & Suconota, A. (2018). *Viabilidad y morfología de ovocitos bovinos de ovarios de*. Obtenido de Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30082/1/Trabajo%20de%20titulacion.pdf>
- FAUBA. (2017). *fecundacion in vitro en bovinos*. Argentina. Obtenido de facultad de agronomia Universidad de Buenos Aires.
- Fernandez, A. (29 de Abril de 2007). *Fisiologia y Reproduccion*. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/3731/373139068005.pdf>

- GARDÓN, C. (1999). *Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización in vitro*. Obtenido de UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA: <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/407/13079219.pdf?sequence=2>
- Gardon, J. C. (Diciembre de 1999). *Universidad de Cordoba Facultad de Veterinaria*. Obtenido de Utilizacion de antisueros H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilizacion invitro.
- Gómez, L. F. (2006). *Universidad de la Salle-Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Obtenido de Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular OPU y fecundación in vitro FIV como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras o de las hembras cebuinas dentro del plan de o del plan de modernización del h: <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/135>
- Gonzaga, E. V. (2012). *Universidad San Francisco de Quito*. Obtenido de Maduración in vitro de ovocitos colectados post mortem de ovarios de vacas Holstein, Frieslan y jeseý.
- Gonzaga., E. D. (2012). *Maduración in vitro de ovocitos colectados postmortem de ovarios de vacas Holstein Friesian y Jersey*. Obtenido de Universidad San Francisco de Quito Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1522/1/103319.pdf>
- Gonzalez, J. (23 de Junio de 2013). *Univio.Es*. Obtenido de Univio.Es: <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/17747/TFMjimena.pdf;jsessionid=2E6D1201966872CA10C9D4E63C8697C0?sequence=3>
- Hafez, B. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. En B. Hafez, *Reproducción e inseminación artificial en animales* (págs. 70-82). Mexico D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- Handle. (2002). *REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS*. Obtenido de https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Reproduccion_Animal.pdf

- HILARIO, J. P. (2018). *Universidad Autonoma Agraria "Antonio Narro"*. Obtenido de Produccion in vitro de embriones en invierno y verano en vacas Holstein, Friesian en la comarca lagunera.
- Janke, M. W. (2015). *Ecaluation of in vivo-derived bovine embryos*. Colorado - EE.UU.: 1era Edicion. Obtenido de valuation of in vivo-derived bovine embryos.
- Krisher, L. (1 de Enero de 2004). Obtenido de https://academic.oup.com/jas/article-abstract/82/suppl_13/E14/4807401
- LA HORA. (05 de Marzo de 2017). Obtenido de [https://lahora.com.ec/noticia/1102036167/con-la-bendicic3b3n-de-las-nuevas-instalaciones-por-parte-del-padre-euclides-carrillo-inicic3b3-el-acto-de-inauguracic3b3n-de-la-central-genc3a9tica-de-la-asociacic3b3n-de-ganaderos-\(asogan\)](https://lahora.com.ec/noticia/1102036167/con-la-bendicic3b3n-de-las-nuevas-instalaciones-por-parte-del-padre-euclides-carrillo-inicic3b3-el-acto-de-inauguracic3b3n-de-la-central-genc3a9tica-de-la-asociacic3b3n-de-ganaderos-(asogan))
- Lange, V. B. (1 de Agosto de 2008). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2596678/>
- Li, R. Q. (2 de Diciembre de 2015). *PubMed Central*. Obtenido de ¿La reducción del tiempo de coincubación de gametos mejora los resultados clínicos: un estudio retrospectivo?: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4717136/>
- Méndez, M. (2014). Efectos de cinco dosis de quitosano para el establecimiento in vitro del plátano dominico hartón (Musa AAB Simmonds) en la zona de Daule. 10.
- Mocha, A., & Quezada, A. (2017). *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS DE OVARIOS DE MATADERO CON TRES PRESIONES DE VACÍO*. Obtenido de Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28317/1/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>
- MORÁN, A. (2018). *UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL CARRERA DE INGENIERIA AGRONÓMICA*. Obtenido de CULTIVO in vitro DE NÍSPERO (Eriobotryca japónica L.) CON LA INTERACCIÓN DE Aloe vera Y GLUTAMINA: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/29045/1/Mor%C3%A1n%20Luna%20Ram%C3%B3n%20Alejandro.pdf>

- Moro, C. D. (2014). *Universidad de Oviedo*. Obtenido de Calidad Ovocitaria en Segundo ciclo vs Primer ciclo. ¿Influye el intervalo de tiempo entre los ciclos?: <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/27665/Celia.pdf;jsessionid=E9DB64D60FA42527AF2EC4BCF79F3529?sequence=3>
- Nunes, D., & Graves, C. (12 de Junio de 2002). *nvovement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes. Theriogenology*. Obtenido de Libreria nacional de Medicina: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11991385/>
- Peláez, V. A. (2011). *“PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS”*. Obtenido de UNIVERSIDAD DE CUENCA: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Pérez, E. (2009). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. *Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México*, 185.
- Ramírez, O., & Jiménez, C. (2016). *Recolección de Oocitos para Procedimientos in Vitro en Bovinos*. Obtenido de Universidad Nacional de Colombia: https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24_recoleccion4/
- Recillas, J. G., & Quintero, J. L. (2013). *Implementación de un protocolo de Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano*. Obtenido de ZAMORANO: <https://revistaproagro.com/wp-content/uploads/2016/06/Fertilizaci%C3%B3n-in-Vitro.pdf>
- RODERO, I. M. (2016). *UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA* . Obtenido de ¿PUEDE LA FIV DE CO-INCUBACION CORTA REEMPLAZAR LA FIV CONVENCIONAL?: <https://revista.asebir.com/puede-la-fiv-de-co-incubacion-corta-reemplazar-la-fiv-convencional/>
- S.E.F. (2002). *Clasificacion y cultivos de ovocitos* . Obtenido de SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD : <https://www.sefertilidad.net/docs/biblioteca/recomendaciones/clasificacion.pdf>
- Salamone, D. (19 de Nobiembre de 2017). *FAUBA*. Obtenido de Facultad de Agronomía de Buenos Aires : <https://www.agro.uba.ar/laboratorios/biotec>

- Salazar. (2017). *Historia del cultivo de tejidos vegetales*. Obtenido de www.calameo.com.
- Torres, J. (21 de Junio de 1975). *Science Direct*. Obtenido de Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte: <https://clincanidus.com.br/wp-content/uploads/2018/05/artigo-3-theriogenology.pdf>
- Ulloa., J. M. (2017). *Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero*. Obtenido de UNIVERSIDAD DE CUENCA: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26216/1/Tesis.pdf.pdf>
- Vargar, P. (2018). *MADURACION DE OVOCITOS BOVINOS CON DOS MEDIOS DE MADURACION DIFERENTES*. Obtenido de UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE CUENCA: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>
- Villamil, P. R. (2013). *CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO*. Obtenido de Universidad Nacional de Córdoba: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/2338/Rodr%C3%ADguez%20Villamil%20-%20Criopreservaci%C3%B3n%20de%20ovocitos%20y%20embriones%20producidos%20in%20vitro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>