



**Fertilización de ovocitos maduros *in vitro* con y sin antioxidantes para la
obtención de cigotos \geq al 40 %**

Llanos Gavilanes, Armado José

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura


Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero
Agropecuario

Carrera Garcés, Fredy Patricio Ph. D.

27 de febrero de 2023

Reporte de verificación de contenido



CERTIFICADO DE ANÁLISIS
registro

Tesis José LLanos

4% Similitudes

0% Tienen entre comillas
las similitudes entre comillas

0% Idioma no reconocido

Nombre del documento: Tesis José LLanos .pdf

ID del documento: a6c3d71348503c21de5047e9f90280f4c0c

Tamaño del documento original: 977,25 kb

Depositar: PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Fecha de depósito: 23/03/2023


Tipo de carga: InterDial

Fecha de fin de análisis: 23/03/2023

Número de palabras: 12.148

Número de caracteres: 75.228

Distribución de las similitudes en el documento



Fuentes principales detectadas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	Reporte de simulación Modelo de simulación de un sistema de control de potencia en un sistema de potencia 1 Fuente similar	1%		Palabras similares: 176/228 (77%)
3	Reporte de simulación Evaluación del impacto de un sistema de control de potencia en un sistema de potencia 1 Fuente similar	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)
2	Reporte de simulación Evaluación del impacto de un sistema de control de potencia en un sistema de potencia 1 Fuente similar	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)
4	Reporte de simulación Evaluación del impacto de un sistema de control de potencia en un sistema de potencia 1 Fuente similar	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)
5	Reporte de simulación Evaluación del impacto de un sistema de control de potencia en un sistema de potencia 1 Fuente similar	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)

Fuentes con similitudes fortuitas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	fcl.hondaitalia.com Productos que influyen en la eficiencia de la cadena de producción de... Reporte de simulación	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)
2	www.elsello.org.ar Efecto de dos medidas de fiscalización en el desarrollo de... Reporte de simulación	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)
3	publinter.com.ar Transporting between airports in a multi-airport environment... Reporte de simulación	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)
4	Reporte de simulación Evaluación del impacto de un sistema de control de potencia en un sistema de potencia 1 Fuente similar	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)
5	fcl.hondaitalia.com Análisis crítico y metodológico del experimento del control de potencia... Reporte de simulación	< 1%		Palabras similares: 1176/228 (515%)

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

- <https://www.elseccion.com.ar/la-union-de-los-estados-unidos-y-el-mercado-comun>
- <https://www.ingenieros.com.ar/la-union-de-los-estados-unidos-y-el-mercado-comun>
- <https://www.ingenieros.com.ar/la-union-de-los-estados-unidos-y-el-mercado-comun>
- <https://www.ingenieros.com.ar/la-union-de-los-estados-unidos-y-el-mercado-comun>
- <https://www.ingenieros.com.ar/la-union-de-los-estados-unidos-y-el-mercado-comun>

Firma:



Firma digitalizada por:
**FREDDY PATRICIO
CARRERA GARCÉS**

.....

Carrera Garcés, Freddy Patricio Ph. D.

Director del Trabajo de Integración Curricular



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Certificado

Certifico que el trabajo de integración curricular. "**Fertilización de ovocitos maduros *in vitro* con y sin antioxidantes para la obtención de cigotos \geq al 40%**" fue realizado por el señor **Llanos Gaviales, Armando José** 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 Universidades de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 27 de febrero del 2023

Firma:



.....
Carrera Garcés, Freddy Patricio Ph. D.

C.C.: 0602031569



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

Responsabilidad de autoría

Yo, Llanos Gavilanes, Armando José, con cedula de ciudadanía n° 1721624920, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: Fertilización de ovocitos maduros in vitro con y sin antioxidantes para la obtención de cigotos \geq al 40 % es de 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 referenciado de citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 27 de febrero del 2023

Firma:

Llanos Gavilanes, Armando José

C.C. 1721624920



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

Autorización de publicación

Yo Llanos Gavilanes, Armando José, con cedula de ciudadanía nº 1721624920, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Fertilización de ovocitos maduros in vitro con y sin antioxidantes para la obtención de cigotos \geq al 40 %** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 27 de febrero del 2023

Firma

.....
Llanos Gavilanes, Armando José

C.C. 1721624920

Dedicatoria

Es una satisfacción dedicarte este trabajo a ti Dios que siempre guía en mi trayecto, bendiciéndome con tu esplendor a cada instante.

Dedico este trabajo de Integración Curricular a mi familia, quien ha estado allí apoyándome en todo momento en mi trayecto de formación profesional, en especial a mi madre y hermanos por brindarme ese apoyo, esfuerzo y trabajo para culminar satisfactoriamente esta etapa de mi carrera.

Dedico para mis seres queridos que no están conmigo, en especial a mi abuelo Luis Alberto Gavilanes, que en mis recuerdos perdurarán que iba a estar presente en esta culminación de mi carrera y los logros que iba a obtener; a mi hermano mayor Fernando Llanos quien fue nuestro ejemplo y admiración de perseverancia, esfuerzo y dedicación de sacar adelante a la familia.

A todas aquellas personas que gentilmente han compartido conmigo su apoyo, amistad, paciencia, conocimientos entre otras virtudes que me han enseñado la perspectiva de mirar las cosas de la vida y prosperando como ser humano.

Agradecimiento

Es un grato esplendor mí agradecimiento a mi familia por el apoyo, el esfuerzo y el amor brindado para finalizar esta meta en mi trayectoria propuesta hasta ahora.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por la oportunidad de formarme como profesional, a todo personal de esta institución que nos compartió sus conocimientos, en especial a los docentes que desinteresadamente me brindaron sus enseñanzas y por las exigencias que nos inculcaron a seguir y superar los obstáculos sin rendirnos.

A mi tutor académico Dr. Fredy Carrera por la paciencia, conocimiento, enseñanza, guía brindada y darme la oportunidad para realizar este trabajo de investigación.

Mis más sinceros agradecimientos al Ing. Fernando Vinueza por el trato, amistad, paciencia, apoyo, conocimientos, consejos y recomendaciones que me ha brindado en todo mi trayecto estudiantil; en las adversidades por los ánimos y palabras de motivación generados para no rendirme, no me cabe en el pecho lo inmenso que estoy agradecido.

Al Ing. Diego Vela docente del IASA I, por ayudarme con la información oportuna de mi trabajo de integración curricular, fue de mucha ayuda para contactarme con personas que estaban enfocados en este tema.

A todas aquellas personas que han compartido, los que han estado conmigo y los que ya no siguen por su amistad, tiempo, conocimiento y apoyo a lo largo de mi carrera e incluso muy agradecido para quienes me ayudaron en este trabajo de investigación que se logre con las metas propuestas.

Índice de contenido

Caráctula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificado	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Resumen	13
Abstract	14
Capítulo I	15
Introducción	15
Antecedentes	16
Planteamiento del problema	17
Justificación	18
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Capítulo II	20
Revisión de literatura	20
Aparato reproductor de la hembra	20
Descripción de los órganos del aparato reproductor	20
Control de la ovulación y del cuerpo lúteo	23

Fisiología de la reproducción	24
Foliculogénesis	25
Maduración del óvulo	25
Transporte y supervivencia de los gametos	25
Fecundación y segmentación.....	25
Implantación	26
Ovogénesis.....	26
Estructura del ovocito y evaluación del ovocito	26
Fertilización <i>in vitro</i>	27
Ventajas y desventajas de la fecundación <i>in vitro</i>	29
Componentes del medio de cultivo para FIV	30
Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno	32
Especies reactivas de oxígenos durante la PIV	33
Antioxidantes en la PIV	34
Antioxidantes enzimáticos.....	35
Antioxidantes no enzimáticos.....	35
Antioxidantes fenólicos	35
Vitamina C	35
Método para la evaluación de antioxidante	36
Capítulo III	37
Metodología	37
Ubicación del área de investigación	37
Ubicación Política	37
Ubicación Geográfica.....	37
Ubicación Ecológica.....	37
Materiales.....	39

	10
Materiales utilizados para la PIV	39
Métodos	40
Diseño experimental	40
Análisis estadístico de varianza	44
Análisis estadístico	46
Protocolo utilizado para el ensayo experimental.....	46
Fase de Fertilización <i>in vitro</i>	48
Fase de Maduración de los presuntos cigotos	50
Capítulo IV	51
Resultados.....	51
Maduración de los ovocitos	51
Número de Oocitos madurados	51
Fertilización <i>in vitro</i>	54
Número de Ovocitos maduros a fertilizar	54
Porcentaje de Motilidad espermática	56
Maduración de los Presuntos Cigotos	58
Número de presuntos Ovocitos fertilizados	58
Número de presuntos Cigotos maduros.....	59
Capítulo V	61
Discusión	61
Capítulo VI.....	63
Conclusiones	63
Recomendaciones	64
Capítulo VI.....	65
Bibliografía.....	65

Índice de figuras

Figura 1 Esquema de producción in vitro para obtener embriones.....	27
Figura 2 Selección de los espermatozoides con el método “Swim-up” y el de gradiente discontinuo.....	28
Figura 3 Diagrama esquemático de la producción de ROS en la célula y sus efectos.....	32
Figura 4 Efecto del estrés oxidativo y las fuentes de especies reactivas de oxígeno durante la producción in vitro de embriones.	34
Figura 5 Mapa de ubicación geográfica del sitio donde se llevó a cabo el ensayo experimental de fertilización in vitro en el Laboratorio de Biotecnología Animal.	38
Figura 6 Estimación de la prueba de Tukey al 95% sobre las medias correspondientes al número de oocitos maduros.....	53
Figura 7 Valoración de la prueba de Tukey al 95% sobre las medias correspondientes a las réplicas de las concentraciones de Vitamina C.	55
Figura 8 Comparación de la prueba de Tukey al 95% sobre las medias correspondientes al porcentaje de motilidad.....	57
Figura 9 Evaluación de la prueba de Tukey al 95% sobre las medias correspondientes de los Presuntos Cigotos maduros.....	60

Índice de tablas

Tabla 1 Descripción de los materiales, equipos e insumos utilizados en el proceso de esta investigación.	39
Tabla 2 Factores y niveles de prueba para la MIV.	40
Tabla 3 Tratamientos generados para evaluar la fase de MIV.	41
Tabla 4 Factores y niveles de prueba para la Fase de FIV.	42
Tabla 5 Tratamientos generados para evaluar la fase de FIV.	43
Tabla 6 Esquema de análisis de varianza para la Fase de MIV.	44
Tabla 7 Esquema de análisis de varianza para la Fase de FIV.	45
Tabla 8 Número de oocitos extraídos, seleccionados y madurados.	51
Tabla 9 Análisis de varianza, para la variable número de Oocitos maduros.	52
Tabla 10 Análisis de varianza, para la variable número de Ovocitos maduros a fertilizar.	54
Tabla 11 Análisis de varianza, para la variable porcentaje de motilidad.	56
Tabla 12 Análisis de varianza, para la variable ovocitos fertilizados.	58
Tabla 13 Análisis de varianza, para la variable número de presuntos Cigotos maduros.	59

Resumen

La producción *in vitro* de embriones, es una herramienta biotecnológica que permite el mejoramiento genético bovino, generando mayor productividad y rentabilidad para los ganaderos. El objetivo de este estudio fue evaluar las soluciones que contenían ácido ascórbico (AA) utilizadas en la maduración y fertilización de oocitos, que fueron recuperados de ovarios de hembras faenadas en el Camal de Santo Domingo, para obtener un porcentaje mayor o igual al 40% de cigotos. El diseño experimental ejecutado, fue un diseño DBCA factorial (A x B) con seis tratamientos y con las variables a evaluar sobre la cantidad de ovocitos madurados, fertilizados y presuntos cigotos se utilizó el estadístico ANOVA y para el análisis de tratamientos se usó la prueba de Tukey con un p value ≤ 0.05 . En el presente estudio se obtuvo 585 ovocitos maduros; cuando se utilizó el medio de maduración TCM 199 1X con AA con una concentración 50 μM , se obtuvo un porcentaje más alto de rendimiento, hubo diferencias significativas en la quinta repetición. La motilidad de los espermatozoides aumentó cuando se encontraban en una solución de Percoll al 90 y 45% + FERT-TALP + Heparina, alcanza el 56,76%; elevando la motilidad en un 30,75% al comparar con el control; se evaluó que el semen no sexado fue el que mayor número de ovocitos fertilizó al comparar con el semen sexado la efectividad fue de 52,91%. En cuanto al número de ovocitos fertilizados y presuntos cigotos maduros, no se encontró diferencias significativas; la dosis de AA en la solución de fertilización no influyó para obtener un mayor número de cigotos.

Palabra clave: Fertilización *in vitro*, Percoll, Ácido ascórbico, ovocitos madurados, presuntos cigotos.

Abstract

The *in vitro* production of embryos is a biotechnological tool that allows the genetic improvement of cattle, generating greater productivity and profitability for cattle breeders. The objective of this study was to evaluate the solutions containing ascorbic acid (AA) used in the maturation and fertilization of oocytes, which were recovered from ovaries of females slaughtered at the Camal of Santo Domingo, to obtain a percentage greater than or equal to 40% of zygotes. The experimental design executed was a factorial DBCA design (A x B) with six treatments and with the variables to be evaluated on the amount of matured, fertilized and presumed zygotes oocytes, the ANOVA statistic was used and for the analysis of treatments the Tukey test was used with a p value ≤ 0.05 . In the present study, 585 mature oocytes were obtained; when TCM 199 1X maturation medium with AA with a 50 μM concentration was used, a higher percentage of yield was obtained; there were significant differences in the fifth repetition. Sperm motility increased when they were in a solution of Percoll at 90 and 45 % + FERT-TALP + Heparin, reaching 56.76 %; increasing motility by 30.75 % when compared with the control, it was evaluated that the non-sexed semen was the one that fertilized the highest number of oocytes when compared with the sexed semen, the effectiveness was 52.91 %. Regarding the number of fertilized oocytes and presumed mature zygotes, no significant differences were found; the dose of AA in the fertilization solution did not influence in obtaining a greater number of zygotes.

Keywords: *In vitro* fertilization, Percoll, Ascorbic acid, mature oocytes, presumptive zygotes.

Capítulo I

Introducción

La fecundación *in vitro* (FIV) tuvo inicio hace 40 años por la aplicación de la tecnología a las especies ganaderas y la era de la producción comercial a gran escala, ha tenido importantes resultados en la mejora continua de producción animal (Bonilla et al., 2021); la Sociedad Internacional de Embriones *in vitro*, reporta un incremento de 15 veces el uso de la FIV en la producción ganadera (Trujillo, 2018). Entre 2015 y 2017 se importaron a Ecuador 2 090 animales de alto valor genético, en 2019 se adquirió 9 500 pajuelas con el fin de aumentar el promedio de inseminaciones (Veloz, 2021). En Santo Domingo de los Tsáchilas existe la Central Genética de la Asociación de Ganaderos (ASOGAN), que empezó a funcionar en el año 2018 en la actualidad poseen 15 reses destinadas a la extracción de ovocitos para producir nuevos embriones (La Hora, 2022). Esto ofrece grandes beneficios a futuro, obteniendo mejora en la eficiencia reproductiva, mejoramiento genético, embriones producidos para mejorar el rendimiento y la rentabilidad de los productores (Moreno, 2018).

En la producción *in vitro* y criopreservación de embriones; existen varios limitantes, como por ejemplo la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Torres et al., 2019) ocasiona una oxidación en las biomoléculas de las células como por ejemplo, lípidos, carbohidratos, aminoácidos y ácidos nucleicos, modificando sus funciones, debido a la disminución del Glutatión (GSH) intracelular, generando una baja en las tasas de clivaje, capacidad de maduración de los ovocitos y blastocistos (Luchini, 2017).

Para reducir el estrés oxidativo, se utilizan los antioxidantes que mejoran los medios de cultivo y aumentan el metabolismo celular; posibilitando en este caso al ovocito conservar un elevado potencial de desarrollo embrionario (Hernández, 2021).

El objetivo principal de este estudio fue realizar la fertilización de los oocitos cultivados en medios con antioxidantes para alcanzar un número mayor o igual al 40 % de cigotos.

Antecedentes

En Ecuador y a nivel mundial la explotación ganadera es uno de los subsectores de importancia establecido para el sector agropecuario, ambiental y social (Taípe et al., 2022); un 84 % de la población rural son propietarios de ganado, el promedio es de 2,8 unidades bovinas adultas (UBA) por hectárea (FAO, 2022).

Las biotecnologías reproductivas han tenido un gran impacto en la producción animal, desde sus inicios con la inseminación artificial (IA) en los años cuarenta transformó la explotación ganadera en avances de mejoramiento genético (Araujo & Quintero, 2017). Otra biotecnología reproductiva utilizada para alcanzar mejoras en el hato ganadero es la producción *in vitro* de embriones bovinos (PIV) (Hincapié, 2019). Durante la última década, la PIV ha aumentado significativamente a nivel mundial, gracias a una mejor comprensión del potencial en el sector pecuario (Gallegos et al., 2022).

Alrededor del 80 % de los ovocitos quedan fertilizados, luego de haber ejecutado la fertilización *in vitro*, pero solo el 40% de estos oocitos fertilizados llegan a generar un cigoto o un blastocisto, este desarrollo permite evaluar la eficiencia global del sistema y la calidad de embriones (Ramírez, 2020).

Se han mejorado una gama de sistemas para cultivo *in vitro* (CIV) con la finalidad de aparentar las condiciones fisiológicas *in vivo* de los embriones bovinos, los medios más frecuentes es una mezcla de agua, fuentes de energía, sales, macromoléculas, soluciones tampón, aminoácidos y antioxidantes (Gallegos et al., 2022). El uso de antioxidantes en la PIV, trae muchas ventajas, como ejemplo, se puede citar la disminución de EROS, aumento de GSH intracelular, la tasa de clivaje, capacidad de maduración de los ovocitos y embriones (Escobar, 2021), disminución de la apoptosis temprana, aumento de ATP mitocondrial entre otros (Luchini, 2017).

Planteamiento del problema

De acuerdo a reportes de entidades gubernamentales como el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGAP) algunas reses son sacrificadas prematuramente por diversos problemas, uno de ellos es la fertilidad; sin embargo, estos animales presentan un enorme potencial genético, que no es aprovechado, por tal motivo el uso de la PIV podría ser una herramienta biotecnológica reproductiva que permita utilizar los oocitos que se encuentran en los ovarios del ganado faenado, como fuente de estudio e investigación.

Las etapas de la PIV son tres, la primera es la maduración de los oocitos, la siguiente la fertilización y la tercera maduración de embriones. Estas fases de la PIV requieren ser cultivadas *in vitro*, pero muestran varias dificultades, como ejemplo, están expuestas a una concentración de oxígeno, alta exposición a la luz, composición del medio de cultivo, cambios en el pH; procesos de centrifugación entre otros (Torres et al., 2019). Al combinarse los factores antes mencionados, pueden producir un alto número de cigotos con retraso en el desarrollo y/o anomalías (Fernández et al., 2007).

Estos problemas a nivel fisiológico y metabólico que presentan los oocitos recolectados de ovarios de los animales sacrificados, son de importancia para el presente estudio, porque nos permitirá entender la función del ácido ascórbico como antioxidante para obtener oocitos maduros, la capacidad fecundante de los espermatozoides, el proceso en sí de la PIV (Fernández et al., 2007).

Justificación

El Ecuador, es una nación en vías de desarrollo, el país tiene la opción de apostar por el mejoramiento ganadero, como una alternativa económica viable; según los datos generados por la Sociedad Internacional de Embriones Bovinos, el Ecuador desde el 2012 ha incrementado la PIV a una tasa promedio de 15.8 % por año (Gallegos et al., 2022).

La PIV abre una nueva dimensión en el campo de reproducción animal, que permitirá utilizar hembras con problemas de fertilidad, que no sean congénitas, como última fuente para obtener embriones de vacas o novillas de alto potencial genético, otras aportaciones para la PIV son: eficiencia del poder fecundante de los oocitos, disminución de los costos de la producción de embriones, facilidad para importar y exportar material genético proveniente de hembras de elevado valor genético, creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados, determinación del sexado de embriones y control de enfermedades reproductivas (Fernández et al., 2007).

Los protocolos de PIV han utilizado moléculas antioxidantes para complementar el medio de cultivo y así reducir la producción de ERO y la muerte embrionaria (Gallegos et al., 2022). La FIV, implica unir los gametos de la hembra y del macho, para obtener un número alto de cigotos, un antioxidante muy conocido es el ácido ascórbico (AA), utilizado en las fases de la PIV, existe evidencia científica que el uso de AA

disminuye la producción de ERO, impidiendo el daño de biomoléculas en especial el ácido desoxirribonucleico (ADN), permitiendo el desarrollo e incremento de los oocitos y cigotos, de acuerdo a la fase de la PIV (Torres et al., 2019).

El objetivo de este estudio fue evaluar las soluciones que contenían AA utilizadas en la maduración y fertilización de oocitos, que fueron recuperados de ovarios de hembras faenadas en el Camal de Santo Domingo, para obtener un porcentaje mayor o igual al 40 % de cigotos.

Objetivos

Objetivo general

Fertilizar ovocitos maduros *in vitro* con y sin antioxidantes para la obtención de cigotos \geq al 40%.

Objetivos específicos

Seleccionar ovocitos maduros *in vitro* sin y con antioxidantes e incubados en cámara de CO₂ al 5%.

Fertilizar ovocitos maduros *in vitro* sin y con antioxidantes e incubar en cámara de CO₂ al 5%.

Madurar ovocitos fertilizados *in vitro* con y sin antioxidantes e incubar en cámara de CO₂ al 5%.

Capítulo II

Revisión de literatura

Aparato reproductor de la hembra

El aparato reproductor de la hembra está conformado por los ovarios, útero, oviductos, cuello uterino, vagina, genitales externos. Su función principal es la producción de óvulos, la fertilización y proporcionar buen estado en la implantación de un nuevo embrión en donde se pueda establecer y crecer en buenas condiciones, hasta su etapa final del desarrollo fetal, logrando nacer sin complicaciones (Hafez y Hafez, 2000).

Descripción de los órganos del aparato reproductor

Ovarios

Se encuentran en la cavidad abdominal de la hembra, realizan funciones exocrinas donde se liberan óvulos y funciones endocrinas como la esteroidogénesis. La forma y el tamaño de los ovarios varía dependiendo de la especie, en los bovinos y ovinos se asemeja a una almendra, en equinos en forma de frijol y en cerdas es similar a un racimo de uvas (Hafez y Hafez, 2000).

Estructura del ovario

Se encuentra constituido por médula y corteza rodeado por el epitelio germinal. La médula ovárica está conformada por el tejido conectivo fibroso elástico extenso de un sistema vascular y nervioso que conecta al ovario a través del hilio. En su corteza ovárica se encuentran folículos ováricos, cuerpos amarillos y en algunos casos ambos dependen de su etapa de desarrollo (Bradley, 2014).

Oviducto

Es un conducto que conecta a cada ovario con el útero, su longitud y grado de arrollamiento varían entre las especies domésticas. Puede dividirse en cuatro segmentos funcionales denominados como fimbrias, el infundíbulo, la ampolla y el istmo (Bradley, 2014).

Mucosa del oviducto

Se encuentra constituida por pliegues primarios, secundarios y terciarios, la mucosa de la ampolla está formada en pliegues elevados ramificados donde su altura disminuye hacia el istmo hasta hacerse más bajos en la unión uterotubárica, aquí se observan células epiteliales cilíndricas ciliadas y no ciliadas que se mueven hacia el útero (Bradley, 2014).

Útero

Está formado por dos cuernos uterinos, un cuerpo y un cuello, su función principal es el transporte de espermatozoides desde el sitio de la eyaculación hasta la fecundación en el oviducto, la regulación del funcionamiento del cuerpo amarillo, implantación, preñez y el parto. Los cuernos uterinos varían en su forma de acuerdo a las especies, en la cerda el útero bicornes y pueden medir de 120 a 150 centímetros de longitud, en las vacas, ovejas y yeguas es de forma bipartido. Sus ambos lados del útero se encuentran unidos a las paredes pélvica y abdominal del ligamento ancho (Hafez y Hafez, 2000).

Cuello uterino

Es una estructura similar a un esfínter que conduce hacia el interior de la vagina. Está formado por tejido conectivo con pequeñas cantidades de tejido muscular liso. Se caracteriza por tener una pared gruesa, en los rumiantes éstas tienen forma de bordes transversales en espiral conocidos como anillos cervicales que se desarrollan de acuerdo a cada especie.

Tienen las siguientes funciones, las cuales son: el transporte de los espermatozoides por el moco cervical hacia el útero, actúa como depósito de espermatozoides, selecciona los espermatozoides viables e impide el paso de los que se encuentran defectuosos (Herradón, 2007).

Vagina

Es el órgano de copulación donde se depositan y coagula el semen hasta cuando los espermatozoides son transportados a través del moco cervical. Posee una pared compuesta de epitelio superficial, una capa muscular y una capa serosa. En la vaca, tienen un esfínter muscular anterior, además de tener el esfínter posterior presentes en otras especies. Las superficies de las células vaginales se encuentran constituidas por varios microbordes colocados longitudinalmente o en círculos (Bradley, 2014).

Genitales externos

Se encuentra conformado por el vestíbulo, los labios mayores, labios menores, el clítoris y glándulas vestibulares (Hafez y Hafez, 2000).

Vestíbulo

Se encuentra en unión con la vagina y está marcado por el orificio uretral externo y por un himen vestigial. En la vaca se extiende hacia el interior entre unos 10 cm hasta el sitio del orificio uretral (Hafez y Hafez, 2000).

Labios mayores y labios menores

Está compuesto por un tegumento en los labios mayores poblado de glándulas sebáceas y tubulares, contienen grasa, tejido elástico y capa delgada conformada por músculo liso; en los labios menores se encuentra un núcleo de tejido conectivo esponjoso (Hafez y Hafez, 2000).

Clítoris

Está conformado por un tejido eréctil cubierto de un epitelio escamoso estratificado con muchas terminaciones nerviosas sensoriales. En las vacas, el clítoris está enterrado dentro de la mucosa vestibular (Bradley, 2014).

Control de la ovulación y del cuerpo lúteo

Ovulación

En especies domésticas, como en las vacas los folículos preovulatorios se seleccionan al principio de la luteólisis, el primer folículo dominante desarrollado desaparece cuando se encuentra a la mitad de la fase luteínica y el segundo empieza a crecer inmediatamente, o en algunos casos un tercero, esto dependerá de la regresión del cuerpo lúteo (CL). La ovulación se produce por el aumento rápido preovulatorio de gonadotropinas siendo estos inducidos por estrógenos. El pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH), comienza aproximadamente 24 horas antes de la ovulación en la mayoría de especies domésticas incluidas la vaca, la cabra, la cerda y la oveja, donde la ovulación se produce en un tiempo aproximado de 10 a 15 horas (Bradley, 2014).

Cuerpo lúteo

Su función principal, es la secreción de progesterona que es esencial para la gestación, el cual se encarga de preparar al útero para el inicio y el mantenimiento de la gestación. Es formado a partir de la pared del folículo ovulatorio, el cual se destruye y se pliega después de producirse la ovulación. En la mayoría de las especies domésticas el CL produce suficiente progesterona en las primeras 24 horas después de la ovulación, la hormona encargada del mantenimiento del cuerpo lúteo es la LH. En animales domésticos grandes no gestantes la secreción uterina de prostaglandina F_{2α} se encarga de controlar la regresión del cuerpo lúteo (Bradley, 2014).

Ciclos ováricos

Los ciclos ováricos de los animales de ovulación espontánea se determinan por presentar dos fases: la folicular inicial y luteínica posterior; en los casos que requieran la cópula para ovular se pueden presentar en la fase folicular. El ciclo ovárico de una hembra que no se encuentra en gestación, se define como el intervalo entre dos ovulaciones consecutivas. En la mayoría de animales domésticos la ovulación se realiza por mecanismos internos, donde los estrógenos procedentes de los folículos antrales empiezan la liberación de gonadotropinas, produciendo la ovulación (Bradley, 2014).

Fisiología de la reproducción

Ciclos reproductivos

Se relacionan con los diversos fenómenos como la pubertad y madurez sexual, estación reproductiva, ciclo estral, actividad sexual de posparto y el envejecimiento. Se encuentran regulados por los diferentes factores ambientales, genéticos, hormonales, fisiológicos y psicológicos (Hafez y Hafez, 2000).

Ciclo estral

El periodo del estro coincide con la ovulación, la duración del ciclo estral dependerá de cada especie como en el caso de la oveja tiene una duración promedio de 16 a 17 días; en la vaca, cerda y cabra de 20 a 21 días y en la yegua de 20 a 24 días. La duración del estro dependerá de cada especie, con respecto a la ovulación, ocurre entre 24 a 30 horas después del inicio del estro en las especies de bovinos y ovinos; de 35 a 45 horas después del estro en las cerdas y de 4 a 6 días después en las yeguas. Este tiempo también está controlado por factores internos y externos de cada especie (Herradón, 2007).

Foliculogénesis

Es el desarrollo de los folículos ováricos desde los folículos primarios en crecimiento hasta su estadio final de maduración. La vaca ovula un solo folículo y se lo puede identificar por su tamaño, unos tres días antes de iniciarse el estro. Durante el crecimiento folicular interviene la proliferación y diferenciación inducidas por hormonas de la teca y de la granulosa causando un incremento en producir estradiol que provoca reacción a las gonadotropinas (Bradley, 2014).

Maduración del óvulo

La maduración está comprendida en dos etapas: la primera en el periodo de crecimiento de los oocitos y la segunda en un periodo final de preparación nuclear y citoplasmática; que es fundamental para realizar la fecundación y el desarrollo normal. Esto se produce por la estimulación dada por la FSH/LH circulantes hasta llegar a su maduración (Hafez y Hafez, 2000).

Transporte y supervivencia de los gametos

En cada especie se determina un tiempo y sitios distintos para realizar el transporte de gametos. En bovinos y ovinos el volumen de semen es escaso y con elevada concentración de espermatozoides; el macho eyacula en el extremo craneal de la vagina y en la entrada del cuello uterino. Al momento de realizar una inseminación se consideran los factores fisicoquímicos e inmunitarios de la vagina y cuello uterino la cual determina la supervivencia de los espermatozoides y su transporte hacía el interior del útero y oviducto (Herradón, 2007).

Fecundación y segmentación

En la fecundación del óvulo ocurre en el oviducto, el desarrollo de métodos de colección de semen y óvulos por medio de técnicas de fecundación *in vitro* exitosas, permite mayor probabilidad de éxito en cruce de bovinos híbridos. La segmentación se produce en el útero en un lapso de 25 a 35 días después de la fecundación, este consiste en la división vertical a lo

largo de un eje principal, sus segmentaciones iniciales suelen ocurrir simultáneamente en todos los blastómeros presentes (Hafez y Hafez, 2000).

Implantación

Es el proceso en donde el embrión en estadio de blastocisto se fija en el endometrio, esto ocurre alrededor de 18 a 20 días después de la fertilización en bovinos. La superficie apical del epitelio uterino se encuentra al principio cubierta por un grueso glucocáliz que se desvanece al darse la implantación. La implantación del embrión en especies bovinas incluye áreas carunculares e intercarunculares en el endometrio uterino (Hafez y Hafez, 2000).

Ovogénesis

Es el proceso mediante el cual se producen óvulos, es realizado en los ovarios y las células precursoras de los óvulos son denominadas ovogonias.

Inician su división desde el tercer mes de gestación dando origen a los ovocitos primarios conocidas también como células diploides, ya en el segundo tercio de la gestación el ovario bovino ya se encuentra repleto de oogonias que contienen folículos primordiales y en el último tercio de la gestación empiezan los estadios iniciales de crecimiento folicular; cuando ya nace una hembra, el número de ovocitos en los ovarios es muy variable que pueden llegar a tener hasta 700 000 folículos en los ovarios (Herradón, 2007).

Estructura del ovocito y evaluación del ovocito

Los ovocitos se seleccionan de acuerdo al grado 1 y 2 mediante técnicas especializadas de aspiración o en aquellos proveniente de camales. La evaluación del ovocito interviene en la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), los ovocitos que son destinados para la PIV se obtienen de ovarios de animales vivos o faenados en el camal utilizando la técnica de aspiración transvaginal. Para la selección de ovocitos se consideran varios criterios morfológicos de acuerdo a una evaluación del número de capas y de la compactación de las

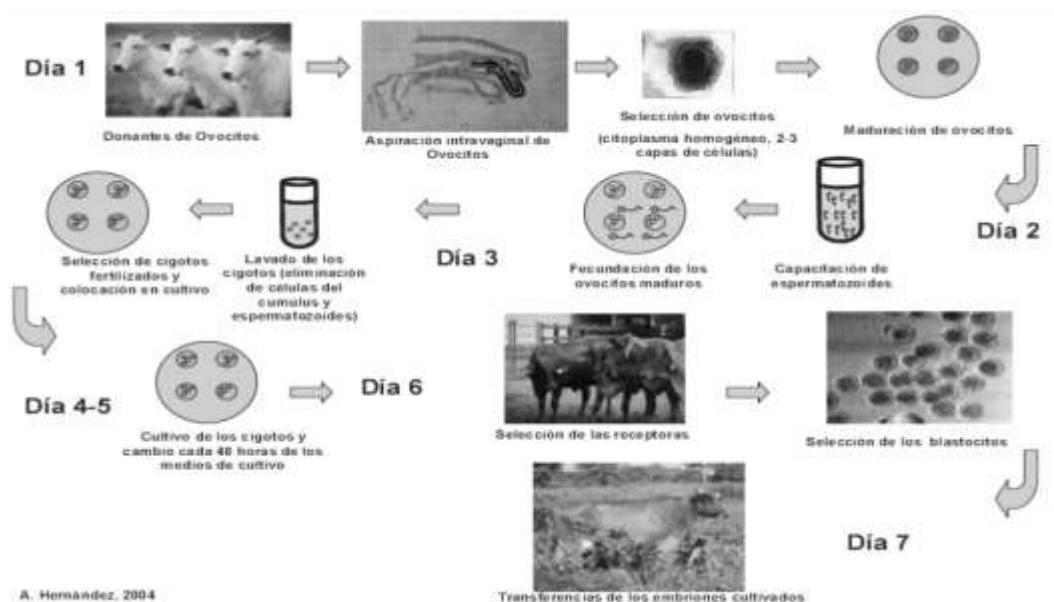
células del *cúmulus oophorus*. Otra forma de selección de ovocitos es de acuerdo a su tamaño por lo que se deben aspirar folículos entre 4 a 8 mm descartando los que no cumplan con estas medidas (Herradón, 2007).

Fertilización *in vitro*

Consiste en ejecutar el proceso de fecundación fuera del tracto genital femenino por lo que se asemeja a una concepción natural; la FIV se basa en la producción de los gametos, para la unión de obtener embriones, para luego transferirlos a una hembra receptora en conseguir nueva cría en rendimiento favorable, valor genético (Perulactea, 2014).

Figura 1

Esquema de producción *in vitro* para obtener embriones.

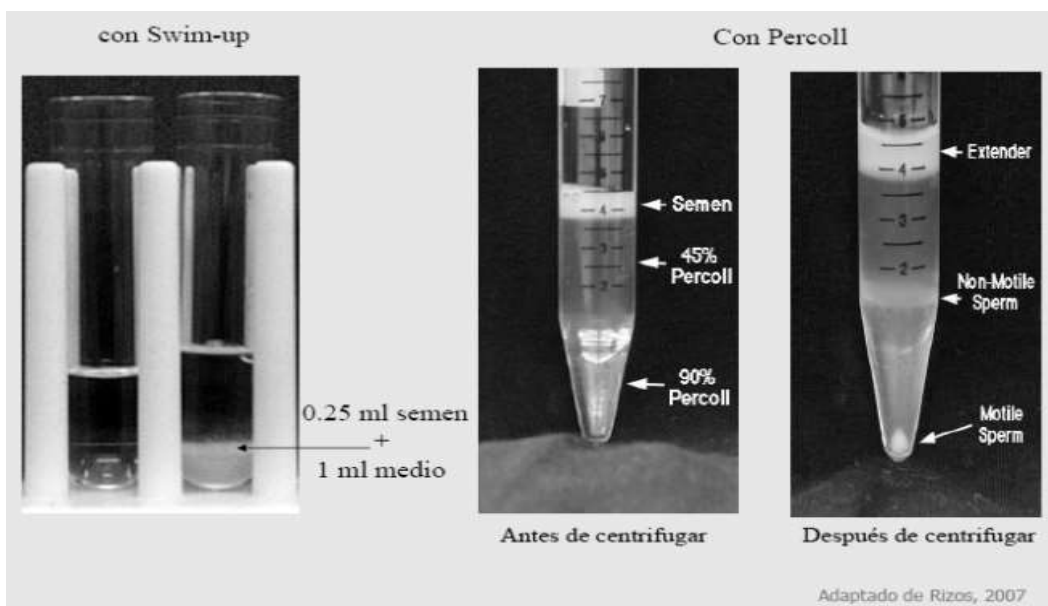


Nota: Se detalla en un esquema sobre la PIV, iniciando en la colecta de los ovocitos esto podría ser *in vivo* hasta estar sometido en el laboratorio por diferentes medios para el desarrollo embrionario, consecuente hasta el día 7 se puede criopreservar o directamente hacer la transferencia embrionaria en vacas receptora, recuperado por (Mantilla, 2012).

Para Gallegos et al. (2022); una vez realizada la FIV, el óvulo con el espermatozoide pasa por una fase de tiempo de incubación entre de 18 - 24 horas durante la FIV, si el semen está congelado se debe descongelar, examinar el poder fecundante; antes de realizar la FIV, este método de recolección de semen se utiliza para eliminar la extensión del plasma seminal y espermatozoides muertos, separando los vivos y móviles. Se utilizan dos métodos para separación del espermatozoide: el método "Swim-up" y el de gradiente discontinuo.

Figura 2

Selección de los espermatozoides con el método "Swim-up" y el de gradiente discontinuo.



Nota: Se expone los dos procesos para la capacitación espermática con swim-up es un método convencional de nadado del esperma con una solución donde el esperma útil se separa con los que están muertos y es similar con la utilización del Percoll en donde el pellet del esperma con mayor vida útil se deposita en el fondo, recuperado por (Mantilla, 2012).

En los espermatozoides hay que generar la capacitación, algunos agentes son la heparina, hipotaurina, epinefrina y penicilina es para ejercer la penetración de la zona pelúcida del ovocito; por lo general, se usa una concentración de 1 a 2 millones de espermatozoides por ml en la FIV. La tasa de fertilización se determina evaluando la tasa de fraccionamiento de 48 horas de la post-fecundación oscilando entre 70 a 85 %, en la FIV se requiere una cantidad pequeña de espermatozoides para fertilizar el óvulo maduro (Gallegos et al., 2022).

Ventajas y desventajas de la fecundación *in vitro*

Ventajas de la FIV

Para Mantilla (2012), las ventajas de esta fase son las siguientes:

- Permite aumentar la obtención de embriones (200-400 embriones/semana/técnico).
- Incremento de los programas de producción de embriones a través de hembras de un alto valor genético, consiguiendo descendencia de elevada calidad genética, debido que este método no interfiere en los ciclos reproductivos.
- Eficiencia en la selección de genes de interés productivo.
- Conservación de razas o especies en peligro de extinción generando un banco de embriones criopreservados.

Desventajas de la FIV

- Bajo rendimiento de ovocitos viables hasta desarrollarse en embriones transferibles estancados en 30 - 40%.
- La calidad de los embriones obtenidos *in vitro* es menor comparado a los embriones generados *in vivo*.
- Aumenta la mortalidad del embrión, además se presentan problemas de abortos y gestaciones prolongadas.

- Nacimiento de terneros con el síndrome de exceso de volumen fetal, generando un descenso en el vigor, nacimiento y provocando mayor mortalidad perinatal.
- Mayor problema de distocia (Mantilla, 2012).

Componentes del medio de cultivo para FIV

Está basado en formulaciones que son similares para los medios de maduración de ovocitos, que se incorporan, compuestos energéticos, aminoácidos, vitaminas, antioxidantes, hormonas, antibióticos, reguladores de pH, agentes quelantes, iones y algunas macromoléculas biológicas o sintética (Gardner, 2008).

Parámetros físicos y elementos inorgánicos

Para Moreno (2018), los parámetros físicos a tener en cuenta son los siguientes:

- **Osmolaridad:** Según las secreciones uterinas el valor promedio óptimo oscila de 280 mOsm/Kg.
- **pH:** Se obtienen buenos resultados con pH neutro o alcalino en una variación de 7,2 - 7,6.
- **CO₂/O₂:** El éxito de utilización de gases es de 5% de CO₂ en el ambiente en la fase de maduración de ovocitos, FIV con 5% O₂ , 90% N₂ y 5% CO₂ en el desarrollo embrionario.
- **Fluido de oviducto:** Contienen altas concentraciones de potasio y bajas concentraciones de sodio, se debe estabilizar adecuadamente con los bicarbonatos, fosfatos y sulfatos.
- **H₂O:** Es el componente básico del medio de cultivo, se recomienda no almacenar por mucho tiempo, ya que el material guardado se puede contaminar con otros residuos (Moreno, 2018).

Compuestos orgánicos

- **Fuentes de energía:** En la FIV, es primordial el uso de piruvato, glucosa y lactato con glutamina ya que son fuente de energía para los embriones, en estadios mayores aumenta el consumo de glucosa; en la eclosión inciden en la síntesis de precursores, de ARN, ADN y lípidos (Moreno, 2018).
- **Fuente de proteína:** Los aminoácidos actúan como buffer dentro de las células y en síntesis proteica; los no esenciales actúan en las fases iniciales del desarrollo embrionario; los esenciales interactúan en la fase mayor con más de 8 células, adicionalmente se suplementan con suero fetal bovino o albúmina sérica bovina (Moreno, 2018).

Medios TCM

Uno de los medios idóneos para realizar el cocultivo de gametos es el TCM; con este medio se intenta reducir la tasa de polispermia, la hipoformación de pronúcleos se concede un amortiguador biológico para estabilizar el pH. Se ha informado que afecta la maduración y la fertilización en la distribución de orgánulos; por otro lado, su uso en el desarrollo embrionario ralentiza el crecimiento y el metabolismo embrionario; en los espermatozoides, tiene una influencia importante en la motilidad y, por tanto, en la unión con el óvulo (Abeydeera, 2002).

Compuestos añadidos al medio

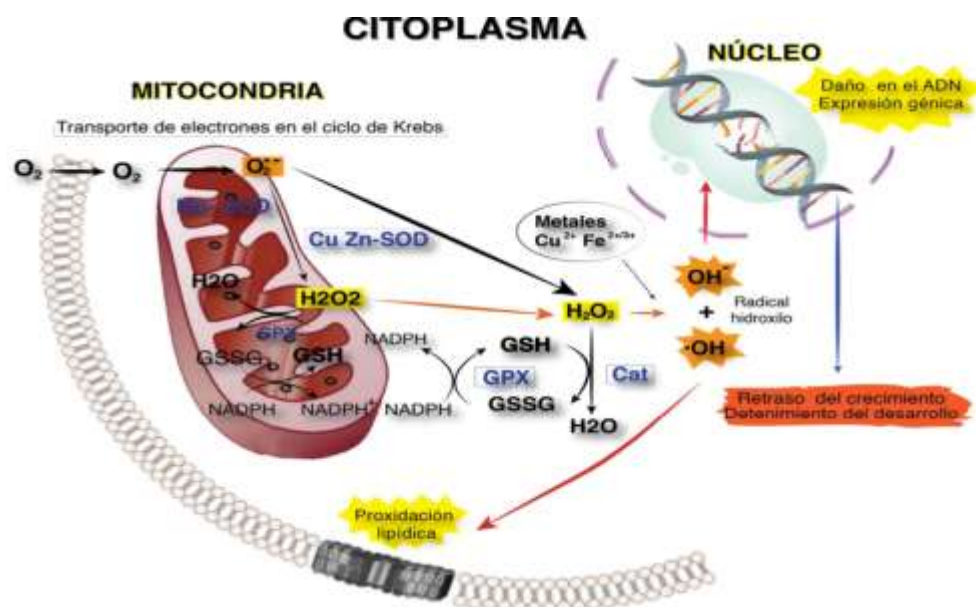
El medio TCM contiene cloruro de calcio, cloruro de sodio y cloruro de potasio para normalizar el pH de forma similar a los fluidos biológicos en rangos de 7-8; en los agregados como TRIS se utilizan suficientemente como amortiguadores, comúnmente denominados con el componente principal de TCM. Además, es muy utilizado como diluyente para la criopreservación de semen; como el benzoato de cafeína cumple la función contra la hipermotilidad de los espermatozoides (Barakat et al., 2015).

Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno

Para Hidalgo et al. (2018), el estrés oxidativo es el resultado de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno. La acción de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (anión superóxido, grupo hidroxilo, radicales alquilo, radicales peroxilo, óxido nítrico y peroxinitrito) producen cambios y modulación de funciones moleculares claves. Esta desproporción se genera por excedente de la ROS y disminución del mecanismo de protección antioxidante, cuando hay un equilibrio de la ROS y su supresión hay una función normal, si es todo lo contrario causa un estrés oxidativo con efectos patológicos (Carvajal, 2019).

Figura 3

Diagrama esquemático de la producción de ROS en la célula y sus efectos.



Nota: Las especies reactivas de oxígeno se genera como efecto de metabolismos aeróbico de la cadena de transporte de la mitocondria, peroxisomas entre otros, recuperado por (Escobar, 2021).

Especies reactivas de oxígenos durante la PIV

La PIV se exponen a factores inductores de ROS, lo que produce un mayor riesgo de estrés que *in vivo*, sus efectos negativos se ven por una deficiencia fisiológica, por un mecanismo de defensa y falta de antioxidantes naturales (Hidalgo et al., 2018).

Las bajas concentraciones de ROS promueven la apoptosis celular, las concentraciones medias inducen la autofagia, las elevadas concentraciones causan la necrosis celular (Torres et al., 2019).

Factores endógenos

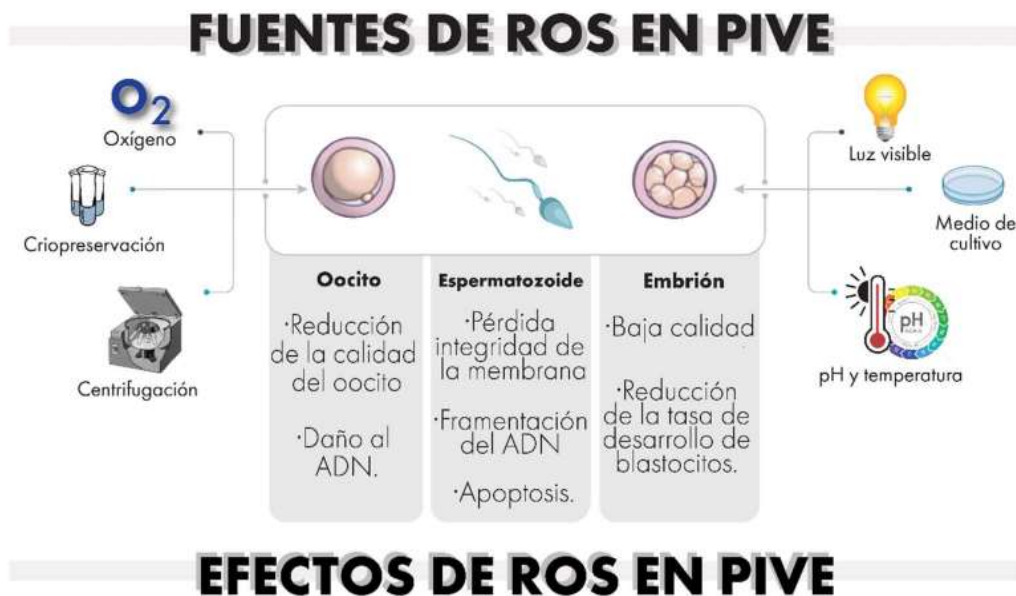
Escobar (2021), argumenta que los embriones producen ATP para generar energía a través de los siguientes mecanismos: fosforilación oxidativa mitocondrial y glucólisis. Durante el desarrollo, el embrión es capaz de generar ROS a través de tres sistemas enzimáticos: fosforilación oxidativa, NADPH oxidasa y el sistema xantina oxidasa. La calidad y el desarrollo embrionario por los altos niveles de ROS son inferiores.

Factores exógenos

Durante la obtención de embriones *in vitro*, se pueden formar varias especies reactivas de oxígeno, este estrés ocurre en diferentes etapas. Los ovocitos están bajo estrés, como consecuencia de una oxidación, agravando la calidad y la conexión con el esperma en la implantación. Las ROS están expuestas en el desarrollo del embrión generando apoptosis y fragmentación que causaría la muerte del embrión antes de la implantación (Jana et al., 2010).

Figura 4

Efecto del estrés oxidativo y las fuentes de especies reactivas de oxígeno durante la producción *in vitro* de embriones.



Nota: Los factores que pueden alterar en el desarrollo de los gametos y del embrión constan, la criopreservación, la concentración de oxígeno, energía, medio de cultivo, luz, pH generando apoptosis o baja calidad, recuperado por (Escobar, 2021).

Antioxidantes en la PIV

Escobar (2021), menciona que los organismos dependen de las defensas para mantener niveles fisiológicos de ROS y reducir el estrés oxidativo; Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de donar electrones a los oxidantes, eliminando su reactividad, haciéndoles inofensivos para las macromoléculas celulares, manteniendo una estabilidad entre antioxidantes/prooxidante y protegiendo así a la célula y microambiente del estrés oxidativo. Estos mecanismos se presentan en el líquido folicular, plasma seminal, e incluso en el líquido oviductal y embriones (Guérin et al., 2001).

Antioxidantes enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos son compuestos de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, enzimas SOD que cataliza la descomposición del anión superóxido en O_2 y H_2O_2 , por lo contrario de CAT convierte H_2O_2 en O_2 y H_2O y GPX reducen los peróxidos en alcohol y agua (Escobar, 2021).

Estimulan el traspaso de electrones desde un agente reductor hacia los radicales libres, cuando hay una reacción estimulada los sustratos utilizados se recuperan de nuevo y se activan con NADPH que fue originario por distintas vías metabólicas (Córdova et al., 2009).

Antioxidantes no enzimáticos

Son participes de la primera y segunda línea de defensa contra la ROS, se caracterizan por su capacidad de inactivar rápidamente los radicales libres como melatonina, carotenoides, entre otros, varios antioxidantes enzimáticos son potenciadores de otras sustancias exógenas que son carotenoides, flavonoides, vitaminas E y C (Escobar, 2021).

Antioxidantes fenólicos

Escobar (2021) expone, que los compuestos fenólicos o polifenoles son moléculas formadas durante el metabolismo secundario de las plantas; su base de formación es el grupo fenólico, es decir el grupo hidroxilo unido a un anillo aromático, considerados como agentes biológicos antibacterianos, antiinflamatorios, antialérgicos, propiedades hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales, etc.; algunas de estas funciones son atribuidas para eliminar los radicales libres y su actividad antioxidante (Soobrattee & Bahorun, 2005).

Vitamina C

Es un compuesto hidrosoluble y primordial en los fluidos extracelulares, se identifica bajo la forma de ascorbato repartido intra y extracelular; interviene directamente en los

radicales libres, hidroxilo, superóxido y algunos hidroperóxidos lipídicos; también interviene en tocoferoxilo catalizando a vitamina E, ocasionando que el ascorbato quede como radical libre deshidroascorbato. La renovación del ácido ascórbico está sujeta por los reductores no radicales como glutatión o niacina (Córdova et al., 2009).

Método para la evaluación de antioxidante

Los métodos de evaluación no específicos corresponden, a la morfología, desarrollo de gametos y embriones; en la PIV la valoración se determina en la tasa del desarrollo embrionario por las etapas de clivaje y blastocistos eclosionados, lo que indica la eficiencia de la acción *in vitro*; en la calidad del embrión el parámetro es la criotolerancia, los más competentes toleran esta acción. Otros parámetros son la tasa de supervivencia y eclosión embrionaria de la post-fecundación de 24 a 48 horas de la FIV (Ambrogi et al., 2017).

Escobar (2021) menciona que la medición de los niveles de ROS se lo puede realizar con un marcador fluorescente (2', 7'- diacetato de diclorofluoresceína - H₂DCFDA) un compuesto de difusión estable que entra fácilmente en la célula y se hidrolizada por esterasas intracelulares para formar 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (DCHF), esto queda dentro de la célula, permitiendo la identificación.

Distintos antioxidantes ejercen a la estimulación de GSH intracelular que interviene en la ROS para reducir ese estrés oxidativo (Escobar, 2021). Se considera la GSH un biomarcador primordial, porque mide la viabilidad y calidad de los ovocitos y embriones utilizando el marcador fluorescente 4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroximarina (Célula rastreador azul CMF₂ HC) (Madrid et al., 2019), la interacción de esta reacción atrapa el sustrato en el citoplasma y se genera la coloración por causa de la GSH (Escobar, 2021).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del área de investigación

Ubicación Política

País	:	Ecuador
Provincia	:	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón	:	Santo Domingo de los Colorados
Parroquia	:	Luz de América
Sector	:	Km 24 Vía Santo Domingo – Quevedo; Hacienda Zoila Luz

Ubicación Geográfica

El estudio se llevó a cabo en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo, ubicada en la parroquia Luz de América, km 24 de la vía Santo Domingo – Quevedo.

Latitud	:	00° 24' 46.36'' S
Longitud	:	79° 18' 44.03'' O
Altitud	:	270 m.s.n.m.

Ubicación Ecológica

Zona de vida	:	Bosque húmedo tropical (bh-T)
Altitud	:	224 m.s.n.m
Temperatura media	:	24,6 °C
Precipitación	:	2870 mm/año

Humedad relativa	:	85 – 90 %
Suelos	:	Franco limo arcillosos
Luminosidad	:	10 – 12 Horas/día – 680 h luz/año

Figura 5

Mapa de ubicación geográfica del sitio donde se llevó a cabo el ensayo experimental de fertilización *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología Animal.



Nota: Elaborado por Llanos, A (2023).

Materiales

Materiales utilizados para la PIV.

Tabla 1

Descripción de los materiales, equipos e insumos utilizados en el proceso de esta investigación.

Equipos	Materiales	Reactivos	Insumos
Microscopio de contraste de fase con platina térmica	Micro pipetas Cajas Nunc Cámara Leja	Cloruro de sodio Cloruro de potasio Bifosfato de sodio	Ovarios Pajuelas de semen congelado
Incubadora de dióxido de carbono	Puntas de 10,100 y 1000 μ l	Cloruro de calcio dihidratado	
Cámara de flujo laminar	Cajas Petri Vaso de precipitación de 100, 250 ml	Cloruro de magnesio hexa hidratado TCM 199	
Platinas térmicas		Suero de ternero SFB	
Baño María		Gentamicina	
Tanque de Nitrógeno	Tubos falcón	Piruvato de sodio	
Tanque de CO ₂	Tubos eppendorf	LH	
Cámara de cultivo	Gradillas	Estradiol	
Estereoscopio	Frascos de vidrio	Insulina	
Centrifuga	Filtros de 0,02 μ	FSH	
Balanza analítica	Jeringas de 5,10 y 20 ml	Suero fetal bovino libre de aminoácidos	
Equipo (CASA)		Glucosa	
Termómetro	Probeta de vidrio Papel toalla		

Libreta de campo	Glicina
Esfero	Solución HEPES
Lápiz	Carbonato ácido de sodio
	Estreptomicina
	Penicilina
	Percoll al 90 %
	Lactato de sodio
	Aceite mineral
	Vitamina C

Nota: Se detalla los materiales, equipos e insumos que se utilizan para el ensayo.

Métodos

Diseño experimental

Factores de investigación de prueba para la Fase de MIV.

Tabla 2

Factores y niveles de prueba para la MIV.

Factores	Niveles
Medios de maduración	TCM 199 1X
	TCM MEN 10X
Vitamina C	0 μ M
	40 μ M
	50 μ M

Nota: En esta tabla se determina los factores y niveles para la maduración *in vitro* con y sin vitamina C.

Tratamientos a comparar para MIV.

El número de tratamientos son seis, con seis repeticiones entre los dos medios de maduración con tres diferentes concentraciones de Vitamina C.

Tabla 3

Tratamientos generados para evaluar la fase de MIV.

Tratamiento	Código	Descripción
1	TCM 199 1X	Medio de maduración TCM199 1X sin Vitamina C
2	MEM 10X	Medio de maduración MEN 10X sin Vitamina C
3	TCM 199 1X + 40 μ M Vitm. C	Medio de maduración TCM199 1X con 40 μ M Vitamina C
4	MEM 10 X + 40 μ M Vitm. C	Medio de maduración MEN 10X con 40 μ M Vitamina C
5	TCM 199 1X + 50 μ M Vitm. C	Medio de maduración TCM199 1X con 50 μ M Vitamina C
6	MEM 10 X + 50 μ M Vitm. C	Medio de maduración MEN 10X con 50 μ M Vitamina C

Nota: Se expresa los tratamientos que serán ejecutados para la evaluación de la fase de MIV en esta investigación.

Tipo de diseño para FIV.

Se empleó un diseño de bifactorial AxB, en donde A=Medio de maduración y B=Concentración de Vitamina C (μ M) con un DBCA (Diseño de bloques completamente al azar).

Repeticiones: Se generó seis repeticiones por tratamientos.

Factores de investigación de prueba para la Fase de FIV.

Tabla 4

Factores y niveles de prueba para la Fase de FIV.

Factores	Niveles
Vitamina C	0 μ M
	40 μ M
	50 μ M
Semen	S1: Semen no sexado
	S2: Semen sexado

Nota: En esta tabla se determina los factores y niveles generados para la evaluación de la FIV con y sin Vitamina C y con dos tipos de semen en el caso del semen no sexado fue conservado hace 4 meses en el laboratorio de Biotecnología Animal de la ESPE-SS y el semen sexado fue adquirido y conservado hace 10 años en el mismo laboratorio.

Tratamientos a comparar para la Fase de FIV.

El número de tratamiento son seis con tres repeticiones de dos tipos de semen (sexado y no sexado) con el medio de fertilización de FERT-TALP más heparina con tres distintas concentraciones de vitamina C.

Tabla 5

Tratamientos generados para evaluar la fase de FIV.

Tratamiento	Código	Descripción
1	S1+0µMVitm. C	Semen no sexado con FERT-TALP +Heparina
2	S1+40µMVitm. C	Semen no sexado con FERT-TALP +Heparina+40µM Vitm.C
3	S1+50µMVitm. C	Semen no sexado con FERT-TALP +Heparina+50µM Vitm.C
4	S2+0µMVitm. C	Semen sexado con FERT-TALP +Heparina
5	S2+40µMVitm. C	Semen sexado con FERT-TALP +Heparina+40µM Vitm.C
6	S2+50µMVitm. C	Semen sexado con FERT-TALP +Heparina+50µM Vitm.C

Nota: Se expone los tratamientos que serán ejecutados para la evaluación de la fase de Fertilización.

Tipo de diseño para la Fase de Fertilización *in vitro*

Se generó un esquema Bifactorial de AxB en donde A=Concentración de Vitamina C (µM) y B=Semen, empleando un DBCA.

Repeticiones: Se generó tres repeticiones por tratamientos.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = i sujeto bajo la combinación del j valor del factor A y el K valor del factor B.

μ = media común de los datos del ensayo experimental.

α_j = impacto del j nivel de la variable de tratamiento A.

β_k = efecto del k valor de la variable de tratamiento B.

$(\alpha\beta)_{jk}$ = efecto de la interacción entre e j valor de A y el k valor de B.

ε_{ijk} = erro experimental o efecto aleatorio del muestreo.

Análisis estadístico de varianza

Esquema de análisis de varianza para la Fase de MIV.

Tabla 6

Esquema de análisis de varianza para la Fase de MIV.

Fuentes de variación	Grados de libertad	
Factor A	(A-1)=1	1
Factor B	(B-1)=1	2
Interacción AxB	(A-1)(B-1)	2
Error experimental		12
Total		17

Nota: Análisis de varianza usado para la Maduración *in vitro*.

Esquema de análisis de varianza para la Fase de FIV.

Tabla 7

Esquema de análisis de varianza para la Fase de FIV.

Fuentes de variación	Grados de libertad	
Factor A	(A-1)=1	1
Factor B	(B-1)=1	2
Interacción AxB	(A-1)(B-1)	2
Error experimental		12
Total		17

Nota: Esquema para el análisis de varianza usado para la Fertilización *in vitro*.

Coefficiente de variación: Para determinar el coeficiente de variación se generó la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{\sqrt{CME}}{\bar{X}} * 100$$

Donde:

CV= Coeficiente de variación

CME= Cuadrado medio del error

\bar{X} = Media general del experimento

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Infostat, para el estudio de las variables tanto de la fase de maduración de ovocitos, fertilización *in vitro* y presuntos cigotos se utilizó el estadístico ANOVA y para el análisis de tratamientos se usó la prueba de Tukey con un p value ≤ 0.05 .

Protocolo utilizado para el ensayo experimental

Fase de Maduración *in vitro*

Al iniciar el protocolo se limpió con amonio cuaternario y con alcohol al 70% al área de trabajo en el laboratorio. La esterilización de los materiales de vidrios y metálicos se lavó con agua destilada y se esterilizó en la autoclave, se depositó los materiales en la estufa para que estén inocuos.

Preparación de la solución de lavado y transporte de los ovarios

En un vaso de precipitación de 1 000 ml, se colocó 500 ml de agua bidestilada, se agregó 8.5 g de NaCl y 80 μ l de penicilina/estreptomicina, se aforó a 1 000 ml y se refrigeró a 4°C.

Preparación de solución Dulbecco 150 ml

Se agregó 100 ml de agua destilada ultra pura en probeta y se adicionó los siguientes compuestos: 1.2 g de NaCl, 0.03 g de KCl, 0.03 g de KH_2HPO_4 , 0.0001 g Na_2HPO_4 . En otro vaso de precipitación se incorporó 50 ml de agua destilada ultra pura que se emulsionó con 0.015 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.0198 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Luego se mezcló las dos soluciones y se agregó 0.15 g de Glucosa y 0.0054 g de Piruvato de sodio.

Preparación de Dulbecco enriquecido

En 100 ml de la solución Dulbecco stock se disolvió 300 mg de BSA y se agregó 100 μ l de Gentamicina; se filtró en miliport de 0.2 μ m.

Preparación del medio de maduración de los ovocitos 10 X y 1X TCM 199

En dos tubos falcón se adiciona las siguientes soluciones 9 ml de TCM STOCH médium 10 X y 1X; 1 ml de Suero Fetal Bovino SFB; 10 µl de Gentamicina; 10 µl Piruvato de sodio 0,2 mM; 10 µl de LH y 15 µl de FSH, se almacena en refrigeración a 4°C.

Colección de ovarios y recuperación de los ovocitos

Se colectó los ovarios en el Rastro Municipal de la Ciudad de Santo Domingo de los Colorados en una solución salina de lavado de transporte a temperatura entre 37 a 40°C; se retiró el tejido excesivo y fueron trasportados en un lapso de tiempo < 2 h al laboratorio. Al llegar en el laboratorio; los ovarios se traspasaron a una nueva solución de lavado que previamente estaba atemperado a 37°C con la solución de Dulbecco enriquecido. Los folículos antrales de 3 a 22 mm de diámetro fueron puncionados, empleando una jeringa de 20 ml con aguja de 18 G, que contenía entre 2 a 3 ml de Dulbecco enriquecido, se aspiró el líquido folicular se había depositado en tres cajas Petri calentadas en una platina térmica a 37°C.

Lavado y selección de los ovocitos

En dos cajas Petri se añadió la solución de Dulbecco enriquecido, previo a la culminación de la punción folicular, se observó en el estereoscopio los ovocitos y se hizo la respectiva selección según los grados I y II.

Maduración *in vitro*

Una vez realizada la selección de los oocitos tipo I y II, en una caja Nunc se puso 50 µl del medio de maduración con y sin antioxidantes, se colocó un aproximado de 13 a 45 oocitos por gota de solución a cada tratamiento, se adicionó aceite mineral y se colocó en la incubadora a 38.5°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa, se esperó por 24 horas para la evaluación de la maduración.

Fase de Fertilización *in vitro*

Se realizó las soluciones de SP-TALP y FERT-TALP, dos horas antes de ejecutar la selección de los ovocitos madurados *in vitro*.

Preparación de solución SP-TALP stock

En un vaso de precipitación de 50 ml se vertió 30 ml de agua ultra pura y se adicionó los siguientes compuestos 292.2 mg de NaCl, 11.55 mg de KCl, 1.8 mg de KH_2HPO_4 , 14.7 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.05 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 184 μl de Lactato de sodio, 119 mg de HEPES, 105 mg de Na_2HPO_4 , se incorporó rojo fenol según la concentración se agitó de manera manual y se aforó para completar los 50 ml, se llevó a refrigeración.

Preparación de SP-TALP enriquecido

En un tubo falcón se adicionó 10 ml de la solución de SP-TALP stock y se mezcló con 10 μl de Gentamicina y 60 mg de BSA FV, se esperó que se diluyera para ser filtrado, luego de eso se etiquetó y se incubó en la Cámara de CO_2 .

Preparación de solución de FER-TALP stock

En un vaso de precipitación de 50 ml se adicionó 30 ml de agua ultra pura y se añadieron los siguientes compuestos 333 mg de NaCl, 11.9 mg de KCl, 2.4 mg de Na_2HPO_4 , 12.2 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 93.5 μl de Lactato de sodio, 119 mg de HEPES, 105 mg de NaHCO_3 , se incorporó 50 μl de rojo fenol, se aforó para completar los 50 ml, finalmente se llevó a refrigeración.

Preparación de solución de fecundación de FERT-TALP enriquecido

En un tubo falcón se adicionó 10 ml de solución de FERT-TALP y se agregó 10 μl de Piruvato de sodio, 10 μl de Gentamicina y 60 mg de BSA FV, se dejó que se disuelva, se filtró y se incubó en Cámara de CO_2 .

Preparación de gradiente de Percoll al 90 y 45%

En tu tubo eppendorf se agregó 125 μ l de Gradiente de Percoll y se mezcló con 125 μ l de SP-TALP stock para generar el Gradiente de Percoll al 45 %. En un tubo falcón se adicionó 250 μ l de Gradiente de Percoll al 90% luego de eso se colocó el Gradiente de Percoll al 45%, se llevó a incubar en la Cámara de CO₂.

Manejo del semen para FIV

Se seleccionó y descongeló una pajilla de semen a baño María a 37°C durante 30 s, se secó la pajuela, se cortó y se depositó en un tubo eppendorf de 2 ml; se tomó 5 μ l de la muestra y se evaluó la motilidad progresiva en el sistema CASA; se tomó 450 μ l de semen y se agregó en la gradiente de Percoll, se centrifugó durante 25 minutos a 500 rpm, pasado el tiempo se retiró el sobrenadante evitando remover el pellet, se adicionó el SP-TALP enriquecido se llevó a centrifugación durante 5 minutos a 500 rpm, se retiró el sobrenadante y el pellet se mezcló con 600 μ l de FERT-TALP enriquecido, se añadió 15 μ l de heparina, y finalmente se agregó el antioxidante en este caso AA.

Fertilización *in vitro*

La caja Nunc se precalentó a 37°C en platina térmica, pasado el tiempo de la maduración de ovocitos se observó y seleccionó los ovocitos que tenían mayor expansión de las células del *cúmulos oophorus*, de la solución anterior se tomó 150 a 200 μ l.

Se puso en la placa Nunc, se adicionó aceite mineral, posteriormente se introdujo los oocitos maduros en cada gota formada con la solución de fertilización y se dejó en la incubadora a 38.5°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa, se esperó por 24 horas para la evaluación de fertilización de los gametos.

Fase de Maduración de los presuntos cigotos

Preparación de solución SOF de trabajo

En un tubo de precipitación se agregó 10 ml de agua ultra pura y se mezcló con 269 μ l de NaCl, 71.6 μ l de KCl, 118.2 μ l KH_2HPO_4 , 100 μ l de Glucosa, 200 μ l de Taurina, 100 de Glutamina, 50 μ l de Glicina, 200 μ l de BMEaa, 100 μ l de MEMaa, 15 μ l de Piruvato de sodio, 4.7 μ l de Lactato de sodio, 17.1 μ l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 49 μ l de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 21 mg de NaHCO_3 luego que se diluyó se etiquetó y se llevó a refrigeración.

Manejo de los presuntos cigotos para el desnudamiento

Transcurrido las 24 horas post fertilización *in vitro*, se observó los presuntos ovocitos fertilizados y se seleccionó para generar el desnudado de las células del *cúmulos oophorus* utilizando una micropipeta se depositó los presuntos cigotos en una caja Petri que contenía solución del Dulbecco enriquecido para hacer el primer lavado, se seleccionó los presuntos cigotos que no se han desnudado y se puso en un tubo eppendorf con 300 μ l de Dulbecco que se centrifugó durante 5 minutos a 500 rpm, los presuntos cigotos pelados se colocó en el segundo lavado precalentado, se realizó varios pipeteos. Finalizando, se generó una gota del medio de solución SOF de trabajo con y sin vitamina C y se cubrió con aceite mineral, en cada pocillo se pudo depositar entre 10 a 30 presuntos cigotos y se introdujo a la incubadora a 38.5°C con 5% de CO_2 y 90% de humedad relativa.

Capítulo IV

Resultados

Maduración de los ovocitos

Número de Oocitos madurados

Tabla 8

Número de oocitos extraídos, seleccionados y madurados.

		N° oocitos	N° oocitos	N° oocitos
Repetición	N° Ovarios	recolectados	seleccionados	madurados
I	120	162	108	72
II	120	296	270	134
III	96	113	78	48
IV	100	182	150	92
V	114	201	180	112
VI	80	189	168	127

Nota: Resumen de número de ovarios, oocitos colectados seleccionados y maduros.

En la primera repetición se colectó 120 ovarios en el camal, se extrajo 162 oocitos, y se seleccionó 108 oocitos para la fase de maduración, en esta fase se obtuvo 72 ovocitos, el número mayor de oocitos maduros se produjo en la segunda repetición con 134 oocitos, seguido por la repetición seis que generaron 127, la quinta repetición generó 112 ovocitos maduros, seguida por la cuarta repetición que generó 92, en el caso de la tercera repetición fue la que menor número de oocitos generó en total 48. En el presente estudio se obtuvo 585 ovocitos maduros.

Tabla 9

Análisis de varianza, para la variable número de Oocitos maduros.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
A=Medio de maduración	1	367,36	367,36	43,41	<0,0001
B=Concentración de Vitamina C (μM)	2	114,5	57,25	6,76	0,0045
Tratamiento(5)	5	923,92	184,78	21,83	<0,0001
AxB	2	23,39	11,69	1,38	0,2697
Error	25	211,58	8,46		
Total	35	1640,75			
CV %	17,9				

Nota: *CV=Coefficiente de variación

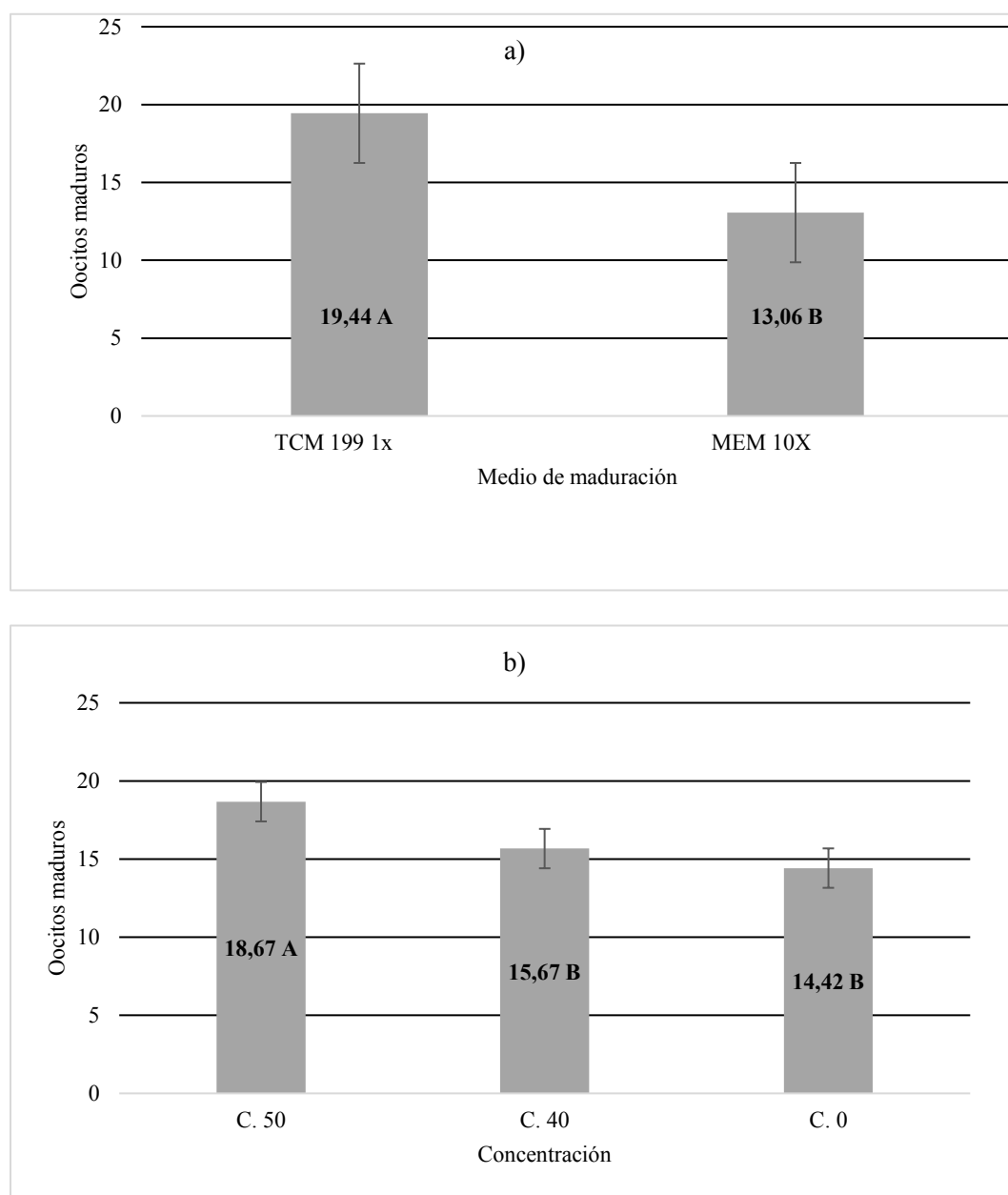
Como se puede apreciar en la tabla 9, existe una diferencia altamente significativa p-value= <0,0001 con el factor A (medio de maduración 1X), la concentración de antioxidante es significativa p-value=0,0045 con 50 μM de vitamina C y el tratamiento cinco es altamente significativa con un p-value= <0,0001 que corresponde al uso del medio de maduración TCM199 1X con 50 μM Vitamina C; sin embargo, en la interacción de los factores A*B, no se encontró diferencia significativa, el coeficiente de variación de 17,9%.

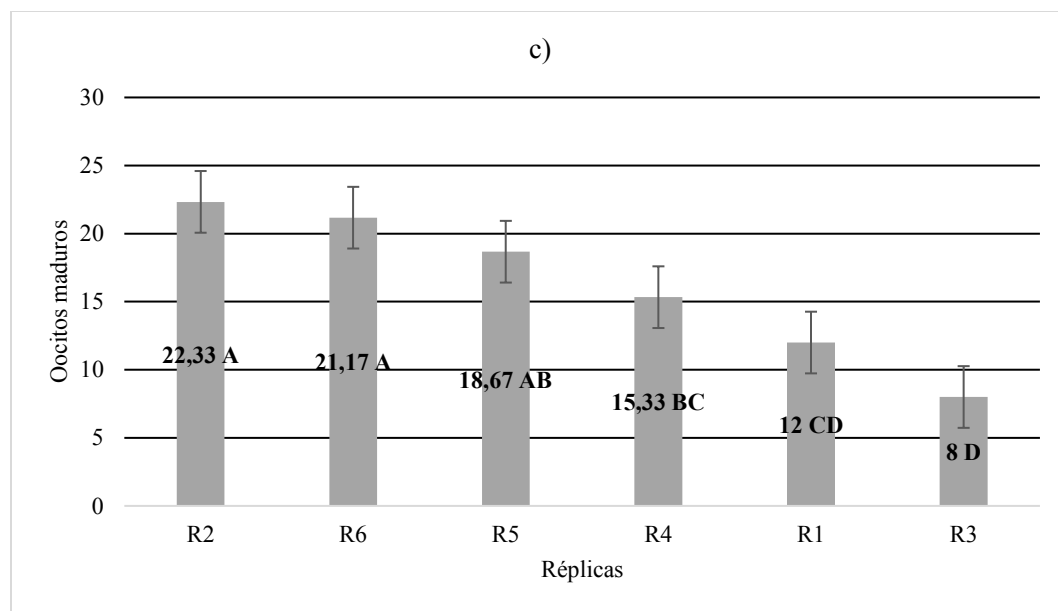
En la figura 6, se observa los resultados de la prueba de Tukey, cuando se utilizó el medio de maduración TCM 199 1X se obtiene mayor cantidad de maduración de oocitos comparado con el medio TCM 199 10X (ver figura 6a) en la figura 6b, se observa la concentración de AA de 50 μM presenta una cuantía más alto de rendimiento en la maduración

de oocitos comparado con las concentraciones de 40 μ M y sin antioxidantes, estos resultados guardan relación con los resultados del análisis ANOVA. En cuanto al número de repetición en este caso la que muestra diferencia significativa es la quinta repetición.

Figura 6

Estimación de la prueba de Tukey al 95% sobre las medias correspondientes al número de oocitos maduros.





Nota: *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fertilización *in vitro*

Número de Ovocitos maduros a fertilizar

Tabla 10

Análisis de varianza, para la variable número de Ovocitos maduros a fertilizar.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
Concentración					
de Vitamina C (μM)	2	112,33	56,17	1,39	0,2925
Tratamiento(1)	5	1723,17	344,63	8,55	0,0022
Error	10	403	40,3		
Total	17	2238,5			
CV %	19,53				

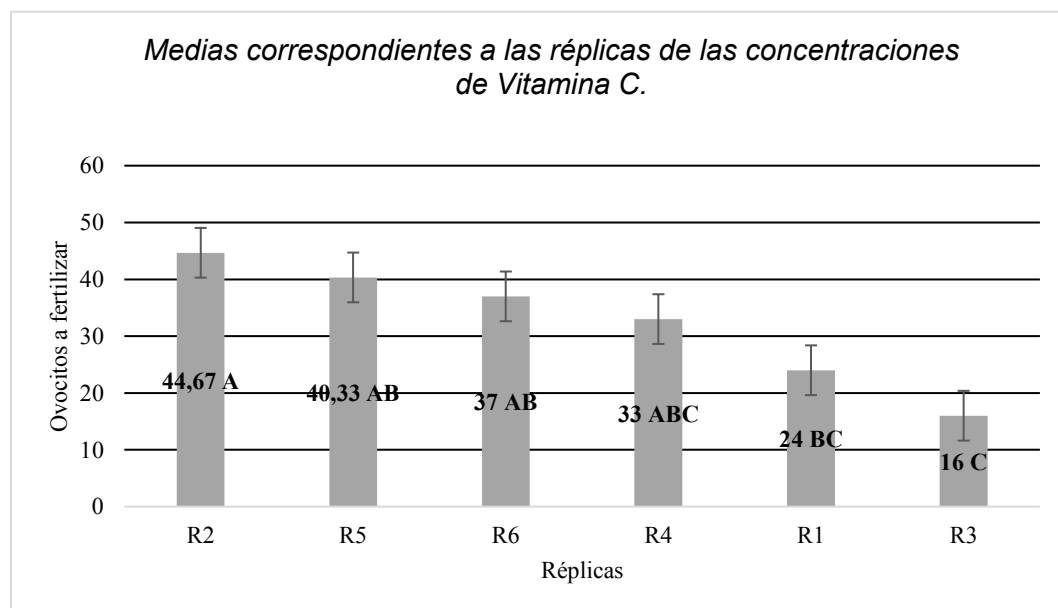
Nota: *CV=Coeficiente de variación

En la tabla 10, se observa los resultados de la prueba ANOVA en cuanto los ovocitos maduros a fertilizar, la quinta repetición muestra un resultado significativo con el valor de $p=0,0022$, y se observa la relación con los resultados del ANOVA de la fase de maduración de oocitos; sin embargo, en cuanto a la variable concentración del AA no muestra diferencias. El resultado fue corroborado por un coeficiente de variación de 19,53%.

En la figura 7, se muestra una clara diferencia significativa en donde la réplica R2 abarca la mejor proporción de entre las medias evaluadas (44,67); es decir, dentro de esta réplica existió mayor cantidad de ovocitos maduros a fertilizar.

Figura 7

Valoración de la prueba de Tukey al 95% sobre las medias correspondientes a las réplicas de las concentraciones de Vitamina C.



Nota: *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). En la figura 7, se puede observar que la segunda repetición a pesar que no muestra significancia genera el mayor número de oocitos fertilizados.

Porcentaje de Motilidad espermática

Tabla 11

Análisis de varianza, para la variable porcentaje de motilidad.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
A= Percoll al 90 y 45					
% - FERT-TALP	1	2029,56	2029,56	33,02	0,0012
+Heparina					
B= Semen	1	1006,13	1006,13	16,37	0,0068
Tratamiento(1)	2	198,07	99,03	1,61	0,2753
AxB	1	48,32	48,32	0,79	0,4094
Error	6	368,76	61,46		
Total	11	3650,84			
CV %		17,92			

Nota: *CV=Coeficiente de variación

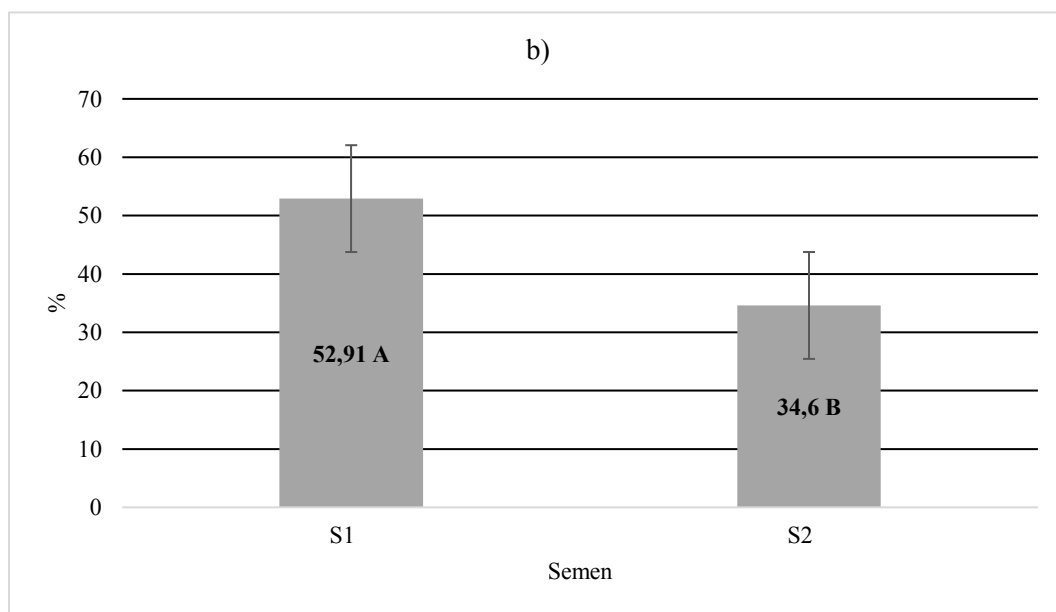
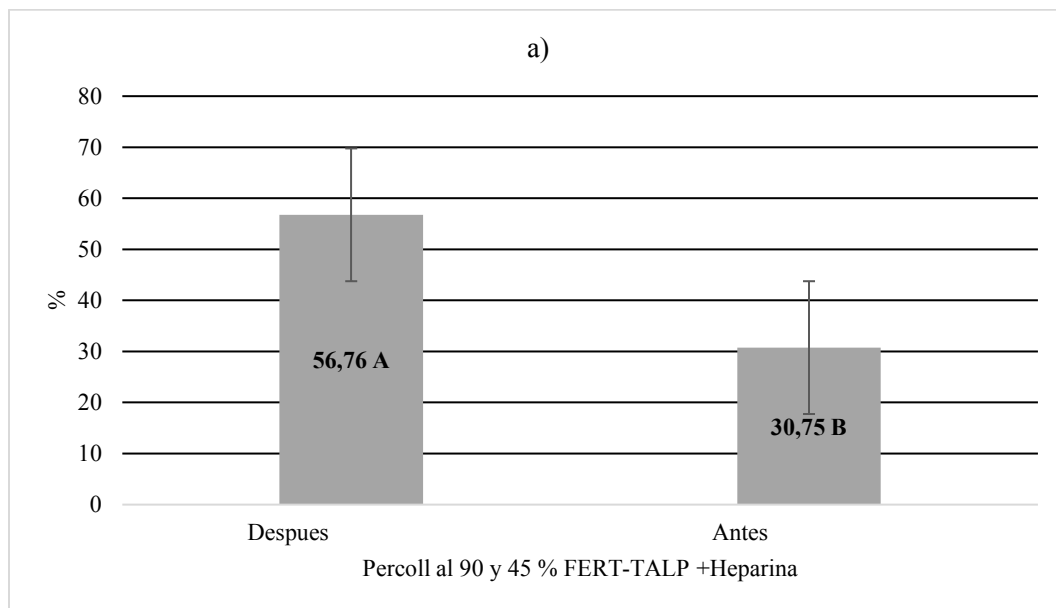
Se observa en la tabla 11, que existe diferencias significativas, en los factores A y B evaluados, cuyo p valor= 0,0012 y 0,0068 respectivamente; sin embargo, en la réplica e interacción no existió diferencia significativa, al trabajar con un coeficiente de variación de 17,92%.

En la figura 8, se observa que la motilidad de los espermatozoides aumenta cuando se encuentran en una solución de Percoll al 90 y 45% +FERT-TALP + Heparina, la motilidad de los espermatozoides alcanza el (56,76%), elevando la motilidad en un (30,75%), comparado con los espermatozoides que no se encuentran en la solución señalada.

En la figura 8b, se aprecia que el semen no sexado fue el que mayor número de ovocitos fertilizó al compararlo con el semen sexado el porcentaje de efectividad fue de (52,91%).

Figura 8

Comparación de la prueba de Tukey al 95% sobre las medias correspondientes al porcentaje de motilidad.



Nota: *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Maduración de los Presuntos Cigotos

Número de presuntos Ovocitos fertilizados

Tabla 12

Análisis de varianza, para la variable ovocitos fertilizados.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
A=Concentración de Vitamina C(μ M)	2	339,11	169,56	2,06	0,1776
B=Semen	1	133,39	133,39	1,62	0,2313
Réplica(2)	2	613,44	306,72	3,73	0,0615
AxB	2	33,78	16,89	0,21	0,8175
Error	10	821,22	82,12		
Total	17	1940,94			
CV %	36,17				

Nota: *CV=Coeficiente de variación

En la tabla 12, se observa que no existe diferencias significativas en la variable de ovocitos fertilizados cuando se agregó en la solución AA, pero el valor de p en la segunda replicación casi se acerca al valor sugerido de p valor de 0,05.

Número de presuntos Cigotos maduros

Tabla 13

Análisis de varianza, para la variable número de presuntos Cigotos maduros.

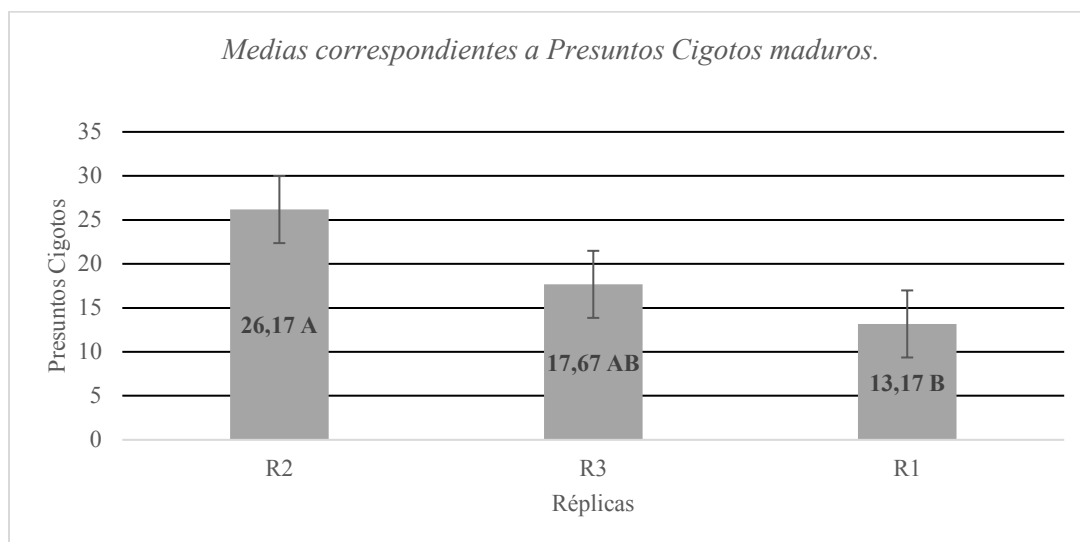
Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado	p-valor
A=Concentración de Vitamina C (μM)	2	336,33	168,17	3,85	0,0574
B=Semen	1	98	98	2,25	0,1648
Réplica(2)	2	523	261,5	5,99	0,0195
AxB	2	16,33	8,17	0,19	0,8321
Error	10	436,33	43,63		
Total	17	1410			
CV %		34,77			

Nota: *CV=Coefficiente de variación

En la tabla 13 la segunda replicación presenta diferencias significativas, el valor de $p=0,0195$, en los demás valores no existe significancia estadística, esta significancia nos dice que la solución SOF trabajo permitió el desarrollo de los presuntos cigotos.

Figura 9

Evaluación de la prueba de Tukey al 95% sobre las medias correspondientes de los Presuntos Cigotos maduros.



Nota: *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 9, se observa un mayor número de presuntos cigotos al utilizar la réplica dos, la media es de (26,17) en comparación con las demás replicas.

Capítulo V

Discusión

En cuanto a la variable que contabiliza el número de Oocitos madurados, se pudo conocer mediante la presente investigación, que el uso del reactivo TCM 199 1X generó mayor cantidad de oocitos maduros (19,44), esto como consecuencia de que el medio TCM 199, es un insumo que posee componentes antioxidantes como glutatión y AA, específicos para promover el desarrollo y protección de los ovocitos (Goicochea et al., 2021) en comparación con los medios conocidos como convencionales como MEM 10X, los cuales priorizan el cuidado de los espermatozoides sin tomar en cuenta las necesidades de los ovocitos (Nedambale et al., 2006); a su vez, al comparar las dosis aplicadas de los medios de maduración, se logró conocer que la dosis más alta 50 μ M fue la que permitió la mayor cantidad de oocitos maduros, como consecuencia de una mayor concentración del medio de maduración, lo que permite mayor exposición de nutrientes y antioxidantes disponibles (Lino y Chasi, 2021), sobre el cual se mantenían expuestos los oocitos.

Por otra parte, al considerar el número de ovocitos maduros a fertilizar, no se encontró variación alguna al aplicar diversas dosis (40 y 50 μ M) de AA en comparación con los ovocitos donde no se aplicó nada, por lo cual, se afirma que las dosis aplicadas fueron excedente, pues Chauhan et al. (2015) mencionan, que el AA, en concentraciones bajas tiene la facultad de actuar como un antioxidante y mejorar la fertilización, mientras que las dosis elevadas de AA, pasan a generar un efecto pro-oxidante (Maldonado et al., 2019), otra causa probable es la falta de aplicación de la vitamina E, pues Dalvit et al. (2005) afirman, que solo el AA no puede trabajar de manera correcta sobre la maduración de los ovocitos, ya que esta debe ser adicionada en conjunto con la vitamina E, para asegurar un efecto positivo en el desarrollo *in vitro*.

Al evaluar el porcentaje de motilidad utilizando el gradiente de Percoll al 90-45%, se logró conocer que luego de agregar FERT-TALP +Heparina, existió mayor motilidad en las muestras evaluadas, como consecuencia directa de la aplicación de FERT-TALP cuya función es favorecer las condiciones adecuadas para el desarrollo y fertilización de los espermatozoides (Pérez et al., 2021), debido a que el TALP (Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato), es una fuente energética que trabaja en conjunto con la glucosa, las mismas que emiten energía, la cual es aprovechada por los flagelos (Salgado-Cruz y Lopera-Vásquez, 2020) a su vez, la heparina, genera una reacción acrosómica y brinda energía, lo que le permite penetrar al espermatozoide con mayor facilidad a la zona pelúcida (Pérez et al., 2021).

Por otra parte, al evaluar la utilización del semen no sexado (S1) y sexado (S2), se logró conocer que el semen no sexado presentó mayor motilidad (52,91%) en la evaluación, lo que resultó ser contradictorio de los resultados obtenidos por Ormachea et al. (2019) quienes afirman que el semen sexado posee esperma de alta calidad con mayor motilidad, siendo contrario a los resultados de la presente investigación, a lo que se le atribuye la falta de un protocolo adecuado en el manejo de las muestras de semen, pues este resulta ser un factor externo que influye firmemente sobre la calidad del mismo (Rubio-Guillén et al., 2007).

En cuanto al número de ovocitos fertilizados y presuntos cigotos maduros, no se encontró diferencia al comparar tanto las dosis de AA, como el tipo de semen, no fue adecuada para cubrir los requerimientos necesarios de los ovocitos y cigotos, y la falta de combinación, con la vitamina E, no permitió obtener resultados que evidencien variaciones, cuando se aplica o no AA, en la actualidad no se conoce sobre datos que corroboren resultados en estudios *in vitro*; sin embargo, en condiciones de campo, para mejorar y asegurar la tasa de preñez se debe utilizar a la par, 3 000 mg de Vitamina C y 3 000 UI de Vitamina E, para favorecer el desarrollo del folículo, la calidad del ovocito y la funcionalidad del cuerpo lúteo (González-Maldonado et al., 2019).

Capítulo VI

Conclusiones

En la Maduración *in vitro* de los ovocitos se determinó que en el medio de maduración existe mayor proporción de oocitos maduros cuando se utiliza TCM 199 1X (19,44), siendo la mejor concentración 50 μ M al presentar el valor más alto de las medias (18,67); a su vez, al comparar las medias de las réplicas se logró identificar que las R2 y R6 fueron las mejores dentro de la evaluación al presentar diferencia significativa en comparación con las demás réplicas; en donde la réplica R2 abarca la mejor proporción de entre las medias evaluadas (44,67), es decir dentro de esta réplica existió mayor cantidad de Ovocitos maduros a fertilizar.

Se ha logrado conocer que existe mayor motilidad cuando se realiza el protocolo de capacitación en gradientes de Percoll al 90 y 45%, generando la gota de solución con FERT-TALP +Heparina (56,76%), logrando elevar el porcentaje de motilidad (30,75%), presente antes de utilizar los compuestos que se habían mencionados, mientras que al comparar el semen sexado utilizado se conoció que el semen no sexado es el que proporcionó mayor motilidad (52,91%) en la evaluación, pero en la fecundidad de los gametos fue similar.

En la Fase de Fertilización *in vitro* estadísticamente no existió diferencia significativa, tanto en los factores evaluados (A=Concentración de Vitamina C y B=Semen), como en la réplica e interacción de dichos factores, al trabajar sobre un coeficiente de variación de 36,17%; se podría mencionar que las dosis aplicadas no fueron optimas o posiblemente por la pequeña cantidad de los ovocitos madurados son referentes que no se hayan dado diferencias entre los tratamientos.

En cuanto al número de ovocitos fertilizados y presuntos cigotos maduros, no se encontró diferencia al comparar tanto las dosis de vitamina C, como el tipo de semen, que se mencionó anteriormente; la dosis de la vitamina C no fue adecuada para cubrir los requerimientos

necesarios de los ovocitos y cigotos bovinos; en la actualidad no se conoce sobre datos que corroboren resultados en estudios *in vitro*; sin embargo, en condiciones de campo para mejorar y asegurar la tasa de preñez se debe utilizar a la par, 3 000 mg de Vitamina C y 3 000 UI de Vitamina E.

Se logró obtener mayor del 40% de cigotos en este ensayo experimental, donde sin antioxidante fue de 44,14% y con antioxidantes es de 60%.

Recomendaciones

Se podría utilizar como medio de maduración TCM 199 1X en la fase de Maduración *in vitro*, porque surgió resultados favorables e incluso suplementando con 50 μM de Vitamina C en esa fase, la fase de Fertilización se deberá hacer otras investigaciones para descifrar la cantidad óptima.

Generar en nuevas investigaciones sobre el uso de Vitamina C con diferentes concentraciones para determinar dosis óptima en el uso *in vitro* en bovinos, tomando de referencia de esta investigación; como mencionan en la literatura en el desarrollo de los ovocitos no sobrepasar de los 750 μMml^{-1} y del embrión $>200 \mu\text{M}$ lo que podría ocasionar un efecto pro-oxidante de este producto.

Evaluar nuevas combinaciones con otros antioxidantes uno de ellos la Vitamina E para comprobar si con la interacción de dos productos ayuda mejorar en la producción *in vitro* realizando varias repeticiones y con mayor cantidad de ovocitos, con esto posiblemente se podría conseguir alguna diferencia significativa entre los tratamientos que sean planteados a futuro.

Reducir el tiempo de manipulación del protocolo Producción *in vitro* para tener gametos de mayor vida útil, empezando en el trayecto de la colección de los ovarios, la aspiración folicular y los otros procesos para la maduración, fertilización y cultivo *in vitro*.

Capítulo VI

Bibliografía

- Abeydeera, L. R. (01 de January de 2002). In vitro production of embryos in swine. *ScienceDirect*, 57(1), 257-273.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X01006707?via%3Dihub>
- Ambrogi, M., Dall' Acqua, P. C., Rocha-Frigoni, N., Leão, B., & Mingoti, G. Z. (25 de January de 2017). Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development in vitro. *Reprod Domest Anim*, 53(3), 409-421.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28120355/>
- Araujo, Á., & Quintero, A. (7 de April de 2017). *Aplicación de biotecnología reproductiva en bovinos en la region caribe colombiana*. Retrieved 29 de November de 2022, from Engormix: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/aplicacion-biotecnologia-reproductiva-bovinos-t40485.htm>
- Barakat, I. A., Danfour, M. A., Galewan, F. A., & Dkhil, M. A. (09 de April de 2015). *Effect of Various Concentrations of Caffeine, Pentoxifylline, and Kallikrein on Hyperactivation of Frozen Bovine Semen*. Retrieved 24 de November de 2022, from Hindawi Publishing Corporation: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/948575/>
- Bonilla, L., Bonilla, D., & Gómez, R. G. (2021). *Vista de Producción de embriones bovinos del laboratorio INVITRO COLOMBIA durante el año 2019*. Retrieved 24 de November de 2022, from Hemeroteca UNAD: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/workpaper/article/view/4242/4512>
- Bradley, G. K. (2014). Cunningham Fisiología Veterinaria. En *Cunningham Fisiología Veterinaria* (Quinta Edición ed.). España.

- Carvajal, C. C. (Marzo de 2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1).
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091
- Chauhan, S., Celi, P., Ponnampalam, E., Leury, B., Liu, F., & Dunshea, R. (2015). Dinámica de los antioxidantes en el animal vivo e implicaciones para la salud de los rumiantes y la calidad del producto (carne/leche): papel de la vitamina E y el selenio. *Ciencia de la Reproducción Animal*, 54(1), 1525-1536.
https://www.researchgate.net/publication/267035679_Antioxidant_dynamics_in_the_live_animal_and_implications_for_ruminant_health_and_product_meatmilk_quality_Role_of_vitamin_E_and_selenium
- Córdova, I. A., Ruiz, L. C., Córdova, J. C., Córdova, J. M., Guerra, L. J., Rodríguez, D. B., & Arancibia, S. K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermatoica. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 01-38.
<https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/download/RCCV0909120001A/22478>
- Dalvit, G., Llanes, S., Descalzo, A., Insani, M., Beconi, M., & Cetica, P. (2005). Efecto del alfa-tocoferol y el ácido ascórbico en la maduración in vitro de ovocitos bovinos. *Reproduction in Domestic Animal*, 1(40), 93-97. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15819954/>
- Escobar, J. C. (07 de Julio de 2021). *Evaluación del efecto antioxidante del Resveratrol sobre la criotolerancia de embriones bovinos de la raza Hartón del Valle producidos in vitro*. Retrieved 19 de November de 2022, from Repositorio Universidad Nacional de Colombia: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/80380/1114823584.2021.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

- FAO. (2022). *Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Producción pecuaria en América Latina y el Caribe*. Retrieved 29 de November de 2022, from www.fao.org: <https://www.fao.org/americas/prioridades/produccion-pecuaria/es/>
- Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (Enero-junio de 2007). Producción In-Vitro de Embriones Bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(1), 51-60. <https://www.redalyc.org/pdf/3731/373139068005.pdf>
- Gallegos, F., Mancheno, A., Mena, L., & Murillo, A. (14 de June de 2022). *Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art Producción de Embriones Bovinos in vitro: Estado del Arte*. Retrieved 18 de November de 2022, from KNE Publishing: <https://knepublishing.com/index.php/epoch/article/view/11192/18144>
- Gardner, D. K. (2008). *Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics*. Retrieved 24 de November de 2022, from PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18154693/>
- Goicochea, J., Rondón, W., Acosta, F., Gómez, Y., Montalvo, M., Salvatierra, M., . . . Ratto, M. (27 de Octubre de 2021). *Efecto de dos medios de fertilización en el desarrollo in vitro de embriones bovinos criollos*. Retrieved 23 de November de 2022, from SciELO Perú: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172021000500018&script=sci_arttext&lng=en
- González-Maldonado, J., Rangel-Santos, R., Rodríguez-de Lara, R., Ramírez-Valverde, G., Ramírez, J., & Monreal-Díaz, J. (2019). Suplementación con ácido ascórbico para mejorar la fertilidad del ganado lechero. *Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 4(10), 1000-1012. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i4.4703>

- Guérin, P., El Mouatssin, S., & Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2), 175-189. <https://redlara.com/images/arq/loe14.pdf>
- Hafez, E., & Hafez, B. (2000). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. En H. E.S.E., *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (Séptima ed. ed.).
- Hernández, J. R. (30 de Marzo de 2021). *Efecto de la adición de antioxidantes durante la maduración de ovocitos y su repercusión en la fertilización y desarrollo embrionario in vitro en especies de importancia económica: una revisión*. Retrieved 24 de November de 2022, from Universidad Autónoma Metropolitana: <https://bindani.izt.uam.mx/concern/tesiuams/1544bp316>
- Herradón, P. Q. (2007). Fecundación In vitro: Alternativa para la mejora genética en bovinos. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*, 1(15), 33-40.
- Hidalgo, M. A., Ortiz, M., & Guerrero, M. (2018). *Estrés oxidativo y antioxidantes*. Retrieved 25 de November de 2022, from Avances en Investigación Agropecuaria: <http://www.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2018/enero/4.pdf>
- Hincapié, J. J. (13 de March de 2019). *La Fertilización in vitro (FIV) en bovinos: una Biotecnología Reproductiva innovadora al servicio del mejoramiento genético*. Retrieved 29 de November de 2022, from Universidad Zamorano: <https://www.zamorano.edu/2019/03/13/la-fertilizacion-in-vitro-fiv-en-bovinos-una-biotecnologia-reproductiva-innovadora-al-servicio-del-mejoramiento-genetico/>
- Jana, S. K., Baku, N., Chattopadhyay, R., Chakravarty, B., & Chaudhury, K. (July de 2010). Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable. *ScienceDirect*, 29, 447-451. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890623810000808?via%3Dihub>

- La Hora. (11 de November de 2022). *Fertilización in vitro en Central Genética de Asogan*. Retrieved 29 de November de 2022, from Diario La Hora: <https://www.lahora.com.ec/santo-domingo/fertilizacion-in-vitro-en-central-genetica-de-asogan-11-noviembre-2022/>
- Lino, A., & Chasi, B. (2021). Efecto de dos medios de maduración sobre la producción de embriones partenogénicos en bovinos. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano*. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/3288c0ea-246c-45fe-acf9-9f7097f4ebce/content>
- Luchini, D. (2017). *Nutrición de vacas en transición en su futuro desempeño reproductivo*. Retrieved 20 de November de 2022, from Ganaderia SOS: <https://ganaderiasos.com/wp-content/uploads/2017/05/NUTRICION-DE-VACAS-EN-TRANSICION-EN-SU-FUTURO-DESEMPEÑO-REPRODUCTIVO-.pdf>
- Madrid, S., López, A., Restrepo, G., Urrego, R., & Echeverri, J. J. (March de 2019). Supplementation with resveratrol during culture improves the quality of in vitro produced bovine embryos. *ScienceDirect*, 221, 139-143. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871141318303974?via%3Dihub>
- Maldonado, J., Rangel-Santos, R., Rodríguez-de Lara, R., Ramírez-Valverde, G., Ramírez, J., & Monreal-Díaz, J. (2019). Suplementación con ácido ascórbico para mejorar la fertilidad del ganado lechero. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(4), 1000-1012.
- Mantilla, M. R. (2012). *Fecundación in vitro como alternativa para el mejoramiento genético en bovinos*. Retrieved 25 de November de 2022, from DSpace ESPOCH.: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2104/1/17T1102.pdf>
- Moreno, D. A. (6 de November de 2018). *Estado actual, proyecciones y perspectivas de la fertilización in vitro (FIV) en la ganadería bovina en Colombia*. - 10596/21321. Retrieved

23 de November de 2022, from Repositorio Institucional UNAD:
<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/21321>

Nedambale, T., Du, F., Xu, J., Chaubal, S., Dinnyes, A., Groen, W., . . . Tian, X. (2006). Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66(1), 1951-1960.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X06002998>

Ormachea, V., Calsin, C., & Zegarra, O. (2019). Cinética y morfometría espermática en semen congelado sexado y convencional de toros Brown Swiss. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 1(30), 500-506. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14696>.

Pérez, J., Restrepo, B., & Usuga, A. (2021). Calidad de semen bovino diluido y congelado en un diluyente con caseinato de sodio. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(6).
<https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i6.21699>

Perulactea. (10 de December de 2014). *Fecundación In vitro en Bovinos – Perulactea*. Retrieved 24 de November de 2022, from Perulactea:
<http://www.perulactea.com/2014/12/10/fecundacion-in-vitro-en-bovinos/>

Pesante, E. (5 de August de 2019). *Mejoras genéticas en ganado bovino en Ecuador, un camino largo y con retos económicos*. Retrieved 17 de November de 2022, from Noticias Agropecuarias: <https://elproductor.com/2019/08/mejoras-geneticas-en-ganado-bovino-en-ecuador-un-camino-largo-y-con-retos-economicos/>

Ramírez, J. A. (13 de October de 2020). *Formación en producción in vitro de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia*. Retrieved 29 de November de 2022, from Universidad CES:
<https://repository.ces.edu.co/bitstream/handle/10946/5135/RAMIREZ%20OROZCO%20>

2020%20Formacion%20en%20Produccion%20in%20vitro%20de%20embriones%20bovinos.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Rubio-Guillén, J., González, D., Garde, J., Estesó, M., Fernández-Santos, M., & Rodríguez-Gil, J. (2007). Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reproduction in Domestic Animals*, , 42(1), 354-357. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.2006.00788.x>

Salgado-Cruz, E., & Lopera-Vásquez, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3). <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17138>

Soobrattee, M. A., & Bahorun, T. (November de 2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *ScienceDirect*, 579, 200-213. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0027510705002587?via%3Dihub>

Taipe, M. V., Duicela, L. A., Solorzano, J. A., Molina, C. A., Zambrano, T., Caiza, F. I., & Aranguren, J. A. (2022). Realidades de la ganadería bovina en la provincia de Manabí. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplina*, 6(4), 311-388. <https://ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/2588/3830>

Torres, V., Urrego, R., Echeveriri, J. E., & López, A. (2019). *Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos*. Retrieved 18 de November de 2022, from Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias | Gobierno | gob.mx: <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/4652/4298#B6>

Trujillo, S. (20 de Noviembre de 2018). *Informe de avance: Producción in vitro de mebriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos Bos Indicus*. Retrieved 23 de November de 2022, from CES: <https://repository.ces.edu.co/handle/10946/4420>

Veloz, A. F. (2021). *Propuesta de un Centro de Investigación y Enseñanza en Biotecnologías Reproductivas*. Retrieved 29 de November de 2022, from CIA - Centro de Información Agraria:

<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/VELOZ%20CHAGUAY%20ALDO%20FERNANDO.pdf>