



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**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**

**TEMA: FERTILIZACIÓN DE OVOCITOS MADUROS *IN VITRO* CON Y SIN ANTIOXIDANTES PARA LA OBTENCIÓN DE  
CIGOTOS  $\geq$  AL 40 %**

**AUTOR: LLANOS GAVILANES , ARMANDO JOSÉ**

**DIRECTOR: DR. CARRERA GARCÉS, FREDY PATRICIO, PH. D.**

**SANTO DOMINGO DE LOS TSÁSHILAS**

**2023**



# Introducción



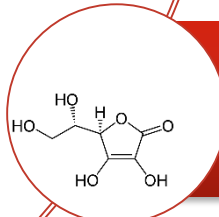
Es uno de los subsectores de importancia establecido para el sector agropecuario, ambiental y social (Taípe et al., 2022).



84 % de la población rural son propietarios de ganado (FAO, 2022).



Durante la última década, la PIV ha aumentado significativamente a nivel mundial (Gallegos et al., 2022).



Disminución de EROS, aumento de GSH intracelular, la tasa de clivaje, capacidad de maduración de los ovocitos y embriones (Escobar, 2021).



# Planteamiento del problema



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.



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).



## FUENTES DE ROS EN PIVE



## EFFECTOS DE ROS EN PIVE



# Justificación

Ecuador desde el 2012 ha incrementado la PIV a una tasa promedio de 15.8 % por año (Gallegos et al., 2022).



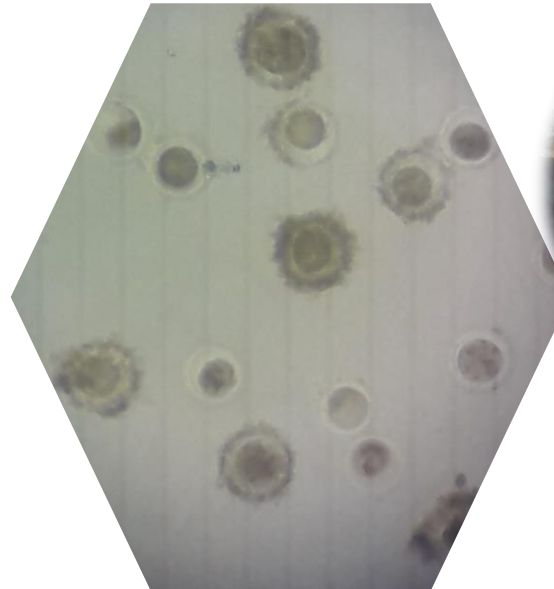
PIV permitirá utilizar hembras con problemas de fertilidad, que no sean congénitas, como última fuente para obtener embriones de alto potencial genético (Fernández et al., 2007).



PIV ha utilizado moléculas antioxidantes para complementar el medio de cultivo y así reducir la producción de ERO y la muerte embrionaria (Gallegos et al., 2022).



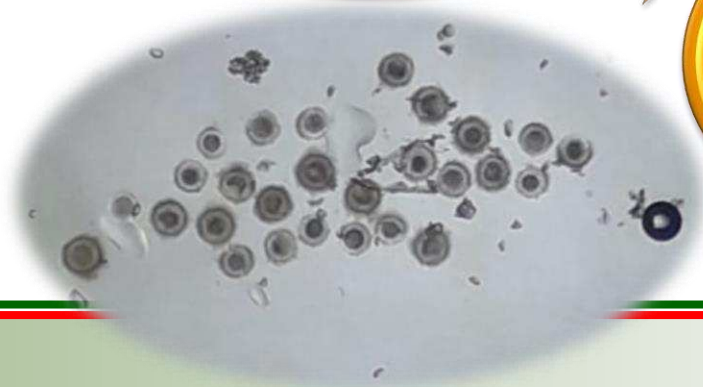
Uso de AA disminuye la producción de ERO, impidiendo el daño de biomoléculas en especial el ADN (Torres et al., 2019).



# Objetivos



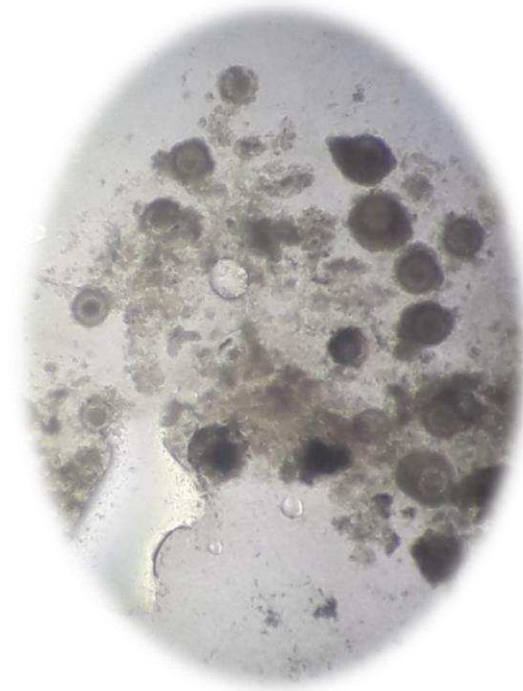
Fertilizar ovocitos maduros *in vitro* con y sin antioxidantes para la obtención de cigotos  $\geq$  al 40%.



Seleccionar ovocitos maduros *in vitro* sin y con antioxidantes e incubados en cámara de CO<sub>2</sub> al 5%.

Fertilizar ovocitos maduros *in vitro* sin y con antioxidantes e incubar en cámara de CO<sub>2</sub> al 5%.

Madurar ovocitos fertilizados *in vitro* con y sin antioxidantes e incubar en cámara de CO<sub>2</sub> al 5%.



# Ubicación del área de investigación

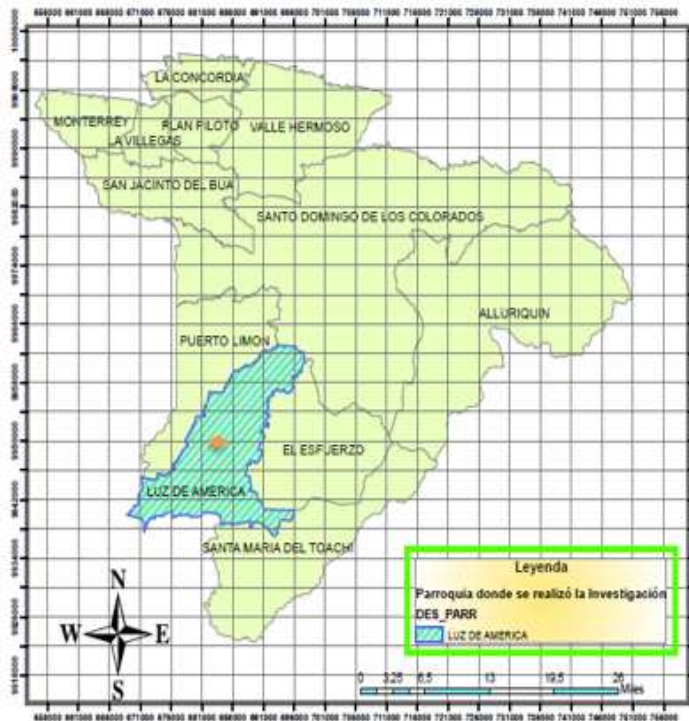


**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

## MAPA DE UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN



### TEMA DE INVESTIGACIÓN

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

### AUTOR

Llanos Gavilanes Armado José

### DIRECTOR

Carrera Garcés Fredy Patricio PhD.

### LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

ESPE Km 24

Parroquia Luz de América  
Santo Domingo de los Tsáchilas  
Ecuador

### Ubicación Política

**País:** Ecuador  
**Provincia:** Santo Domingo de los Tsáchilas  
**Cantón:** Santo Domingo  
**Parroquia:** Luz de América  
**Propiedad:** Hcda. Zoila Luz km 24 Vía Sto. Dgo- Quevedo

### Ubicación Geográfica

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



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# Diseño experimental

## Fase MIV.

### Factores y niveles de prueba para la Fase de MIV.

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

### 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 $\mu$ M Vitm. C	Medio de maduración TCM199 1X con 50 $\mu$ M Vitamina C
4	MEM 10 X + 40 $\mu$ M Vitm. C	Medio de maduración MEN 10X con 50 $\mu$ M Vitamina C
5	TCM 199 1X + 50 $\mu$ M Vitm. C	Medio de maduración TCM199 1X con 40 $\mu$ M Vitamina C
6	MEM 10 X + 50 $\mu$ M Vitm. C	Medio de maduración MEN 10X con 40 $\mu$ M Vitamina C



# Diseño experimental

## Fase FIV.

### Factores y niveles de prueba para la Fase de FIV.

Factores	Niveles
Vitamina C	0 $\mu$ M
	40 $\mu$ M
	50 $\mu$ M
Semen	S1: Semen no sexado
	S2: Semen sexado

### Tratamientos generados para evaluar la fase de FIV.

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





# Protocolo Fase 1:

## Fase de Maduración *in vitro*



### Preparación de solución



### Colección de ovocitos

### Lavado y selección

### Maduración *in vitro*

Lavado y transporte de los ovarios

Dulbecco enriquecido

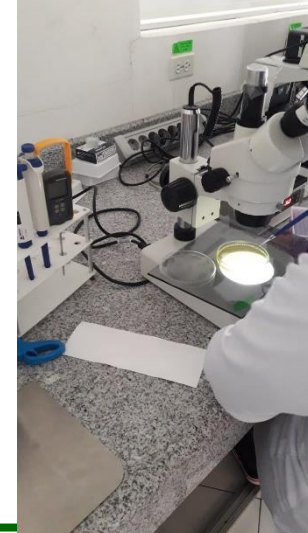
Medio de maduración de los ovocitos 10 X y 1X TCM 199

Aspiración folicular de 3 a 22 mm

Selección según los grados I y II

13 a 45 oocitos por gota de solución a cada tratamiento

Incubar a 38.5°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# Protocolo Fase 2:

## Fase de Fertilización *in vitro*

SP-TALP  
enriquecido

FERT-TALP  
enriquecido

Preparación  
de solución

Gradiente de  
Percoll al 90 y  
45%

Manejo del  
semen para FIV

Evaluación de  
motilidad  
progresiva en  
el sistema  
CASA

Con Percoll, se  
centrifugó durante  
25 minutos a 500  
rpm

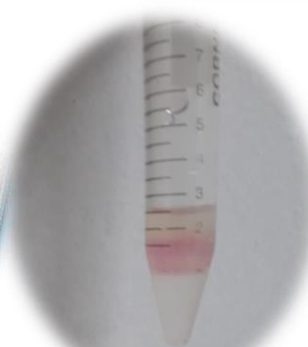
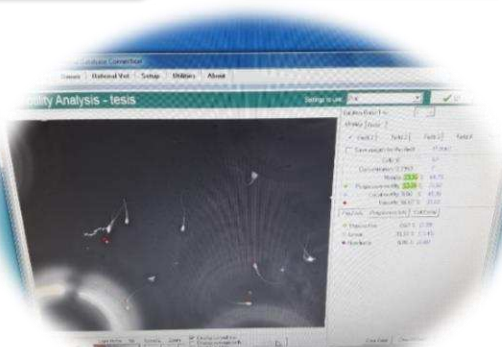
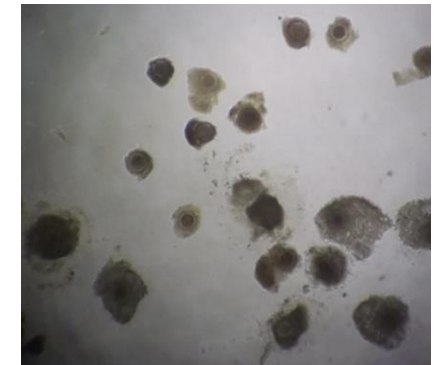
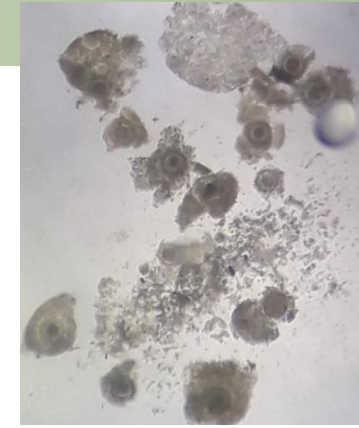
Con SP-TALP  
enriquecido se llevó a  
centrifugación durante  
5 minutos a 500 rpm

Con FERT-TALP  
enriquecido, se  
añadió 15  $\mu$ l de  
heparina

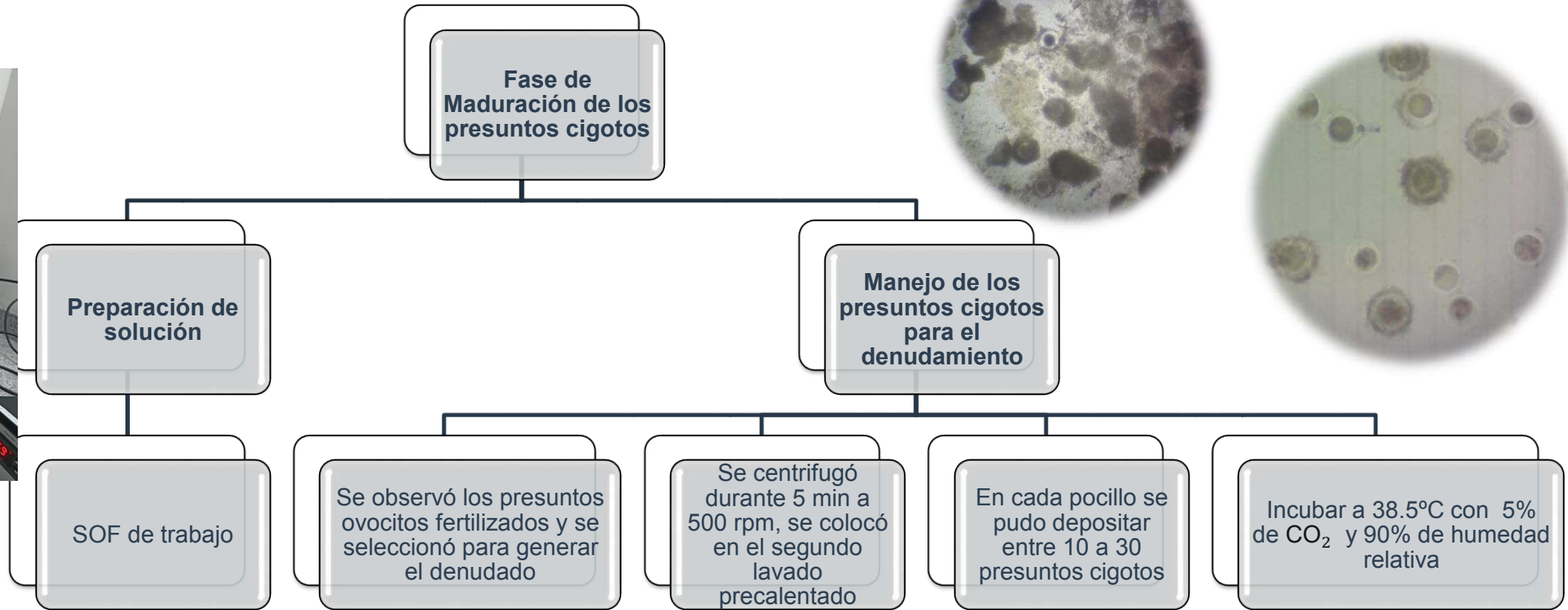
Fertilización  
*in vitro*

Incubar a  
38.5°C con 5%  
de CO<sub>2</sub> y 90%  
de humedad  
relativa

Se observó y  
seleccionó los  
ovocitos que tenían  
mayor expansión de  
las células del  
*cúmulos oophorus*



# Protocolo Fase 3:



# Resultados y Discusión

## Maduración de los ovocitos

Número de oocitos extraídos, seleccionados y madurados.

Repetición	N° Ovarios	N° oocitos recolectados	N° oocitos seleccionados	N° oocitos 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

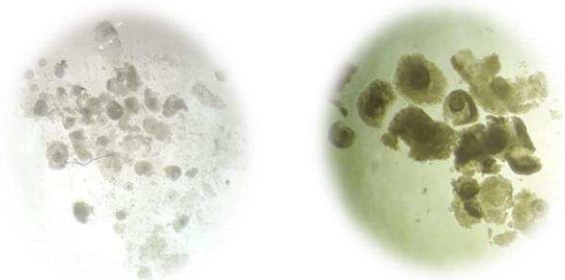
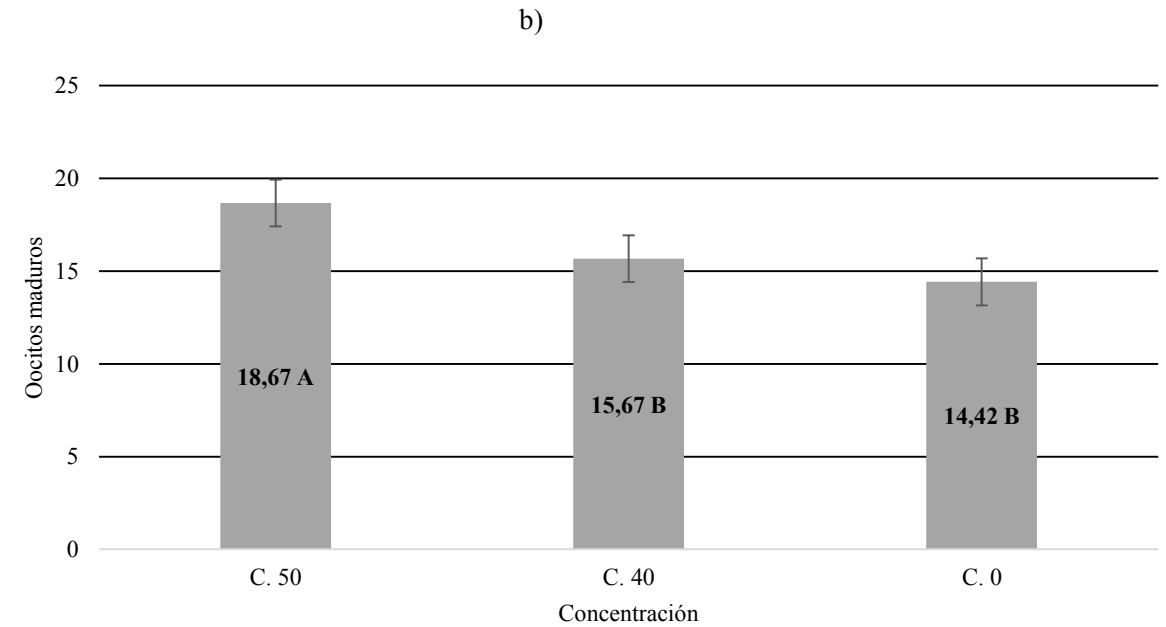
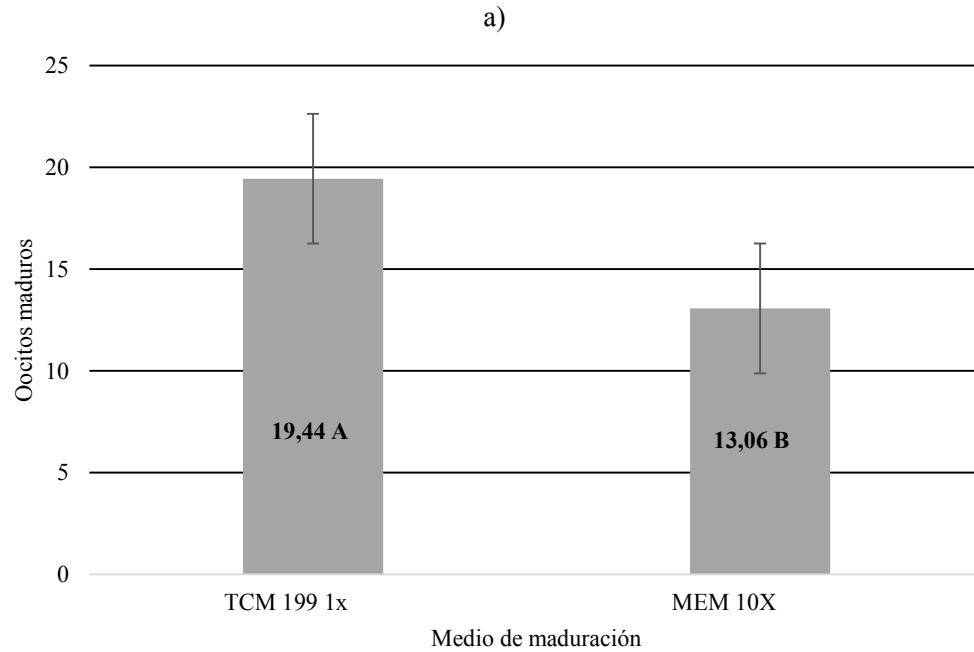
Análisis de varianza, para la variable número de Oocitos maduros.

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				



# Maduración de los ovocitos

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



# Fertilización *in vitro*

## Número de Ovocitos maduros a fertilizar

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

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculado	p-valor	
Concentración de Vitamina C ( $\mu\text{M}$ )	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				

Chauhan et al. (2015) mencionan, que la vitamina C, en concentraciones bajas tiene la facultad de actuar como un antioxidante y mejorar la fertilización, mientras que las dosis elevadas de vitamina C, pasan a generar un efecto pro-oxidante (Maldonado et al., 2019).



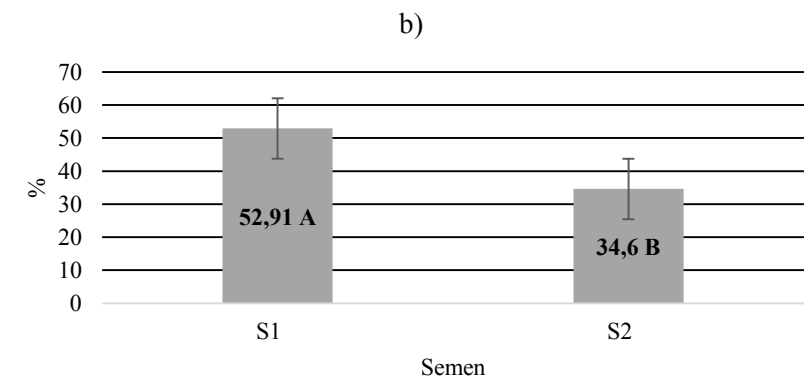
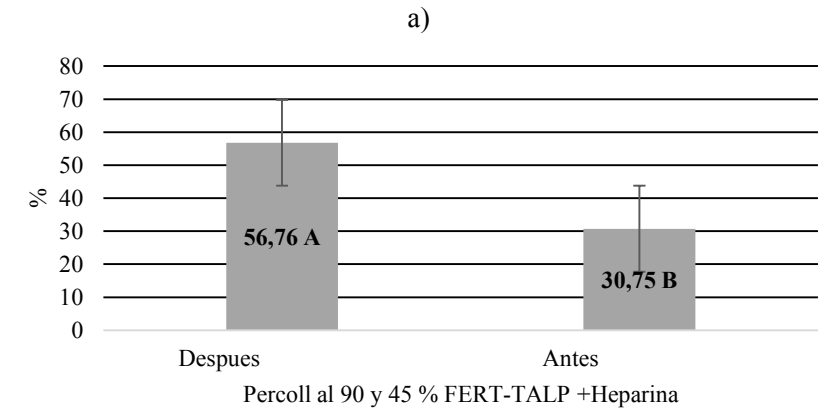
## Porcentaje de Motilidad espermática

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 +Heparina	1	2029,56	2029,56	33,02	0,0012
B= Semen no sexado					
Tratamiento(1)	1	1006,13	1006,13	16,37	0,0068
AxB	2	198,07	99,03	1,61	0,2753
Error	1	48,32	48,32	0,79	0,4094
Total	6	368,76	61,46		
CV %	11	3650,84			
	17,92				

- Favorece las condiciones adecuadas para el desarrollo y fertilización de los espermatozoides.
- Permite penetrar al espermatozoide con mayor facilidad a la zona pelúcida (Pérez et al., 2021).

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



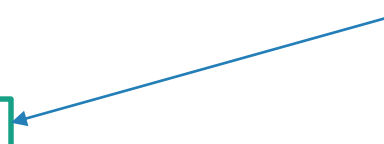
# Maduración de los Presuntos Cigotos

## Número de presuntos Cigotos maduros

*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 ( $\mu\text{M}$ )	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			

Réplica	Concentración de AA. ( $\mu\text{M}$ )	Semen	N° Presuntos cigotos madurados
2	0	S1	21
2	50	S1	36
2	40	S1	29
2	0	S2	16
2	50	S2	26
2	40	S2	29





# Conclusiones

En la Maduración *in vitro*, el medio TCM 199 1X proporcionó un mayor número de oocitos maduros 19,44; siendo la mejor concentración 50  $\mu$ M al presentar el valor más alto de las medias 18,67.

Existe mayor motilidad del espermatozoides al utilizar la gradiente de Percoll al 90 y 45%, generando la gota de solución con FERT-TALP +Heparina (6,76%; logrando elevar la motilidad en un 30,75%.

Al comparar la motilidad del semen sexado con el no sexado este último presentó mayor motilidad de 52,91% en la evaluación, y en la fertilización .

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; 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.

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 sexado), se podría mencionar que las dosis aplicadas no fueron óptimas o posiblemente por la pequeña cantidad de los ovocitos madurados son referentes que no se hayan dado diferencias entre los tratamientos.



# 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  $\mu\text{M}$  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  $750 \mu\text{M}[\text{ml}]^{-1}$  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*.



Muchas gracias



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA