

**Recuperación de ovocitos a partir de Folículos de Graff de 0,6-20 mm de diámetro para la
producción de ovocitos *in vitro***

Cobos Velasco, Ana Karelis

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Carrera Garcés, Fredy Patricio Ph.D.

23 de enero del 2023

Reporte de verificación de contenido



CERTIFICADO DE ANÁLISIS
registro

Tesis Ana Cobos

8%

Similitudes

0%

Texto entre comillas

0% similitudes entre comillas

0% idioma no reconocido

Nombre del documento: Tesis Ana Cobos.pdf	Depositarie: MILTON UNICHO UDAV PATIÑO	Número de palabras: 8645
ID del documento: 833b6c970d471d8c4f031de4e13a71b203c3d9e9	Fecha de depósito: 21/2/2023	Número de caracteres: 56.851
Tamaño del documento original: 853.54 kb	Tipo de carga: Interface	
	Fecha de fin de análisis: 21/2/2023	

Ubicación de las similitudes en el documento:



Fuentes principales detectadas

N°	Descripción:	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 repositorio.uce.edu.ec Evaluación del efecto de la clomocloalmina sobre el desarrollo de Femenos similares	1%		Palabras idénticas: 1% (124 palabras)
2	 repositorio.uce.edu.ec/bitstream/27006/6721/6/PC-00001.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (56 palabras)
3	 repositorio.uce.edu.ec/bitstream/27006/6721/6/PC-00001.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (54 palabras)
4	 doi.org 133812-PLAS-100000 Animal Production Science	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (46 palabras)
5	 dspace.uces.edu.ec/bitstream/23456789/233170/7/Trabajo-de-Titulacion.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (41 palabras)

Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripción:	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 doi.org Cash Journal of Animal Science: Combinations of Trolox and ascorbic acid ...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (68 palabras)
2	 dspace.uces.edu.ec/bitstream/23456789/233170/7/Trabajo-de-Titulacion.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (50 palabras)
3	 doi.org Influence of Follicular Fluid on In Vitro Maturation and Fertilization of Bovin ...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (28 palabras)
4	 repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21600/13375/5/TF-ESPE-057330.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (19 palabras)
5	 ciencia.jesalle.edu.co	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (14 palabras)

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

- 1  <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
- 2  <https://doi.org/10.1016/0093>
- 3  <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/27006/20588/1/PC-00001.pdf.txt>
- 4  <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.003>
- 5  <https://doi.org/10.1111/j.1479-0531.2004.00523.x>

Firma:



Fredy Patricio Carrera Garcés

Carrera Garcés Fredy Patricio

C.C. 0602031569

Director del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"Recuperación de ovocitos a partir de Folículos de Graff de 0,6-20 mm de diámetro para la producción de ovocitos in vitro"** fue realizado por la señorita **Cobos Velasco Ana Karelis**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 febrero del 2023

Firma:



Firmado digitalmente por:
FREDY PATRICIO
CARRERA GARCÉS

.....
Carrera Garcés Fredy Patricio Ph.D.

C. C. 0602031569

Director del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Cobos Velasco Ana Karelis**, con cédula de ciudadanía N° 2300604549, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Recuperación de ovocitos a partir de Folículos de Graff de 0,6-20 mm de diámetro para la producción de ovocitos in vitro”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 febrero del 2023

Firma

.....
Cobos Velasco Ana Karelis

C.C.: 2300604549



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Cobos Velasco Ana Karelis**, con cédula de ciudadanía N° 2300604549 autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Recuperación de ovocitos a partir de Folículos de Graff de 0,6-20 mm de diámetro para la producción de ovocitos in vitro”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 febrero del 2023

Firma

.....
Cobos Velasco Ana Karelis

C.C.: 2300604549

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi madre Rosario Elena Velasco quien me brindó su confianza, sabiduría y fortaleza para afrontar las dificultades. Todo es por ti, te amo y te admiro.

A mi hermana Irlanda Isabel Cobos quien me ha motivado para salir adelante y darle alegría a mi vida.

A Juliana y Paquita, quienes me brindaron su amistad y apoyo a lo largo de mi vida estudiantil y personal. Sin sus ocurrencias mis días serían grises.

A Mimí, Blanca Nieves, Luci y Lucifer, mis mascotas, por aparecer cuando menos los esperaba.

El miedo es el mayor obstáculo en el camino; nos impide vivir, nos quiebra.

Damián

Agradecimiento

A Dios, por guiarme en cada etapa de mi trayectoria universitaria y personal, por ser un pilar importante en mi vida.

A mi madre, sin su sacrificio y valentía ninguna de mis metas sería posible. Por enseñarme a ser una persona de bien, por creer en mí y estar presente siempre que la necesité.

A mi hermana, por darle sentido a mi vida y una motivación para salir adelante.

A mi tutor, Dr. Fredy Carrera, quien, con su amplio conocimiento, me supo guiar durante este proceso.

A mis amigas de infancia, Juliana y Paquita, por compartir conmigo buenos momentos.

A mi amiga Solange Chicaiza, por brindarme su amistad desde el primer instante en que nos conocimos, por hacer amena mi trayectoria universitaria.

A todas las personas que me impulsaron a cumplir mis metas. Muchas gracias por permitirme estar en su vida.

Índice de Contenido

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Resumen.....	15
Abstract	16
Capítulo I.....	17
Introducción.....	17
Planteamiento del problema	18
Justificación.....	19
Objetivos	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos	20
Capitulo II	21
Marco teórico.....	21

Morfología del aparato reproductor de la hembra bovina	21
Anatomía y fisiología del ovario	23
Gametogénesis.....	24
Ovogénesis	24
Foliculogénesis.....	25
Clasificación de los folículos	27
Ciclo Estral.....	28
Proestro.....	28
Estro.....	28
Metaestro	29
Diestro.....	29
Clasificación de los ovocitos	29
Etapas de la producción in vitro de embriones.....	30
Maduración in vitro (MIV)	30
Fertilización in vitro (FIV).....	31
Cultivo in vitro (CIV).....	31
Factores a considerar durante la MIV	32
Temperatura.....	32
Soluciones y medios.....	32

	10
Evaluación de ovocitos madurados.....	33
Capitulo III.....	34
Materiales y Métodos	34
Ubicación del área de investigación.....	34
Ubicación política	34
Ubicación Ecológica	34
Ubicación Geográfica	35
Materiales	36
Transporte de ovarios del matadero.....	36
Aspiración de ovocitos.....	36
Maduración de ovocitos.....	37
Preparación de las soluciones y medios requeridos.....	38
Preparación de la solución de lavado de ovarios.....	38
Preparación de la solución Dulbeco	38
Preparación de la solución Dulbeco enriquecida	38
Preparación de los medios de maduración de ovocitos	38
Traslado de los ovarios del matadero	39
Preparación de ovarios para la aspiración de ovocitos	39
Lavado de ovocitos	39

	11
Maduración de ovocitos	39
Evaluación de ovocitos	40
Diseño experimental.....	41
Factores del experimento.....	41
Tratamientos a comparar	41
Tipo de diseño	42
Repeticiones	42
Análisis funcional	42
Capítulo IV	43
Resultados	43
Registro de ovarios y ovocitos utilizados.....	43
Categorización ovocitaria	43
Evaluación de maduración de ovocitos en cada tratamiento.....	44
Prueba de significación de Tukey para los factores de estudio	48
Resultados de estudio para los medios de maduración (Factor A)	48
Capítulo V	51
Discusión.....	51
Capítulo VI	53
Conclusiones.....	53

Recomendaciones.....	53
Capítulo VII:.....	54
Bibliografía	54

Índice de Figuras

Figura 1	Fisiología del aparato reproductor bovino	21
Figura 2	Representación esquemática del ovario de la vaca	24
Figura 3	Proceso de ovogénesis.....	25
Figura 4	Desarrollo folicular de la hembra bovina	26
Figura 5	Categorización de ovocitos bovinos.....	30
Figura 6	Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación.....	35
Figura 7	Clasificación de los ovocitos madurados.....	44
Figura 8	Resumen de la cantidad de ovocitos madurados.....	44
Figura 9	Estudio del efecto de los medios de maduración (Factor A) en las variables de estudio	49

Índice de Tablas

Tabla 1	Recursos necesarios para el transporte de ovarios del matadero	36
Tabla 2	Recursos necesarios para la aspiración de ovocitos	36
Tabla 3	Recursos necesarios para la maduración de ovocitos.....	37
Tabla 4	Factores y niveles a probar en el trabajo de experimentación	41
Tabla 5	Tratamientos a comparar en el trabajo de experimentación	41
Tabla 6	Registro de ovarios y ovocitos utilizados durante la experimentación.....	43
Tabla 7	Análisis de varianza de la maduración de ovocitos viables.....	45
Tabla 8	Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría I	46
Tabla 9	Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría II	46
Tabla 10	Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría III	47
Tabla 11	Resultados de la prueba de Tukey para el factor A	48
Tabla 12	Resultados de la prueba de Tukey para el factor B	50
Tabla 13	Resultados de la prueba de Tukey para la interacción A*B	50

Resumen

La producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos es una de las técnicas más utilizadas en la biotecnología de la reproducción. Consta de tres etapas, la maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV). El uso de ovocitos provenientes de donantes de matadero permite obtener ovocitos maduros a bajos precios. La calidad de los ovocitos es uno de los factores determinantes durante la MIV puesto que va a determinar el rendimiento del blastocisto. El presente estudio consistió en recuperar ovocitos a partir de Folículos de Graff de 0,6-20 mm de diámetro para la producción de ovocitos *in vitro*. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo. Se utilizaron 252 ovarios de vacas faenadas, se recuperaron 512 ovocitos viables, los cuales fueron repartidos en 4 tratamientos. Se encontraron diferencias significativas entre los medios de maduración utilizados, con una media de maduración en el medio TCM 199 1X de 28.75 frente al medio MEM 10X con 19.13 en el caso de ovocitos madurados viables y para los ovocitos de categoría I en los que se obtuvo una media de 16.13 al utilizar el medio TCM 199 1X y 7.63 al usar el medio MEM 10X. El uso del ácido ascórbico como antioxidante durante la MIV no presentó diferencia significativa, por tanto, no mejoró la maduración ni el desarrollo. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, el tratamiento T2 (TCM 199 1X/ 5mM ácido ascórbico) mejoró mínimamente la MIV.

Palabras clave: ovocitos, TCM 199 1X, MEM 10X, ácido ascórbico, maduración *in vitro*

Abstract

In vitro production (IVP) of bovine embryos is one of the most widely used techniques in reproductive biotechnology. It consists of three stages, in vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC). The use of oocytes from slaughterhouse donors makes it possible to obtain mature oocytes at low prices. Oocyte quality is one of the determining factors during IVM since it will determine the blastocyst yield. The present study consisted of recovering oocytes from Graaf follicles of 0.6-20 mm in diameter for in vitro oocyte production. The research was carried out at the Laboratory of Biotechnology of Animal Reproduction of the University of the Armed Forces ESPE, Santo Domingo. A total of 252 ovaries from slaughtered cows were used, 512 viable oocytes were recovered and divided into 4 treatments. Significant differences were found between the maturation media used, with a mean maturation in TCM 199 1X medium of 28.75 versus MEM 10X medium with 19.13 in the case of viable matured oocytes and for category I oocytes in which a mean of 16.13 was obtained when using TCM 199 1X medium and 7.63 when using MEM 10X medium. The use of ascorbic acid as an antioxidant during IVM did not present a significant difference, therefore, it did not improve maturation or development. There were no significant differences between treatments, however, the T2 treatment (TCM 199 1X/ 5mM ascorbic acid) minimally improved IVM.

Key words: oocytes, MCT 199 1X, MEM 10X, ascorbic acid, in vitro maturation.

Capítulo I

Introducción

La biotecnología orientada a la producción de embriones bovinos, mediante la maduración de ovocitos para su posterior fertilización *in vitro*, es una alternativa para obtener embriones a bajo coste que pueden ser utilizados para fines académicos o comerciales (Peláez, 2011). El proceso de producción de embriones bovinos consta de tres pasos que incluye la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), la fecundación *in vitro* de los ovocitos madurados (FIV) y el posterior cultivo *in vitro* de los ovocitos fecundados (CIV) hasta el día siete que es cuando se encuentra en estado de blastocisto (Quispe E et al., 2018).

Para fines investigativos, los ovocitos generalmente son recuperados de ovarios de vacas sacrificadas en mataderos (Lonergan & Fair, 2016). La recuperación de ovocitos de donantes sacrificadas utiliza dos técnicas principales: aspiración de los folículos de los ovarios o a través de cortes en la superficie del ovario (OIE, 2022).

La maduración *in vitro* (MIV) es uno de los principales pasos determinantes en la producción *in vitro* (Pioltine et al., 2021). Durante la MIV, la calidad del ovocito es el factor principal que determina el rendimiento del blastocisto (Lonergan & Fair, 2016). La selección de los ovocitos en el laboratorio debe cumplir con ciertos parámetros visuales como: aspecto del citoplasma, tamaño del ovocito y células del *cúmulus* que lo envuelven (Vargas & Salomé, 2018).

Considerando la importancia que tiene la recolección de ovocitos para la producción de embriones *in vitro*, el presente estudio busca recuperar ovocitos de hembras donantes de matadero, seleccionar los ovocitos con mejor calidad y someterlos al proceso de maduración en un medio y ambiente controlado.

Planteamiento del problema

Los continuos avances en la biotecnología de la reproducción brindan nuevos y eficaces métodos para seguir innovando (González-Figueroa & Molfino, 2005). Uno de estos métodos es la producción *in vitro* de embriones (PIV). La recolección de ovocitos es un paso importante para poder iniciar la PIV. Es por ello que es necesario conseguir una fuente que permita obtener ovocitos maduros y embriones a gran escala y a precios bajos (Quintana et al., 2012). La fuente más económica para obtener ovocitos es a partir de ovarios de hembras donantes de matadero, por lo que se tiene una gran cantidad de información sobre los factores que afectan la recolección.

Una etapa crítica durante el proceso de fertilización *in vitro* (FIV) es la selección de ovocitos. La cantidad y calidad de los ovocitos empleados en las etapas iniciales constituyen un requisito importante para la PIV (Quispe E et al., 2018). Factores como el diámetro del ovocito, el tamaño folicular, el procedimiento de recolección y la selección de ovocitos influye en la calidad progresiva de los ovocitos (Rodríguez Zamora, 2013). En base a ello, se ha planteado un estudio para recuperar ovocitos bovinos provenientes de matadero, seleccionar los ovocitos con mejor calidad y someterlos al proceso de maduración.

Justificación

La recolección de ovocitos de hembras sacrificadas brinda la posibilidad de aprovechar folículos no ovulatorios, que siguiendo parámetros fisiológicos se volverían atrésicos, con la finalidad de explotar al máximo el potencial genético de una donadora por cultivo *in vitro* (Fernández Reyes et al., 2010).

Esta técnica permite obtener una gran cantidad de ovocitos adquiridos a bajo costo, procedentes de animales que se encuentran en diferentes estados de ciclo estral, que pueden ser madurados, crio preservados, fecundados y cultivados *in vitro* hasta llegar a estados avanzados del desarrollo embrionario (Domínguez Vidal et al., 2020) .

La selección de ovocitos para la maduración de ovocitos es una parte crucial en el proceso de PIV. Se ha evidenciado que la calidad del ovocito es el factor principal que delimita el rendimiento de blastocisto y que el ambiente de cultivo previo a la fertilización, dentro de cierto límite, no tiene una influencia importante en la capacidad del ovocito inmaduro para formar un blastocisto (Lonergan & Fair, 2016).

La calidad de los ovocitos se determina por la capacidad que tienen para madurar, ser fertilizados y obtener descendencia normal por lo que factores como la temperatura de transporte desde el matadero al laboratorio, tiempo de maduración y hormonas pueden repercutir la posibilidad de maduración de los ovocitos (Covelo et al., 2021).

Objetivos

Objetivo general

Recuperar ovocitos a partir de Folículos de Graff de 0,6-20 mm de diámetro para la producción de ovocitos in vitro.

Objetivos específicos

Seleccionar los ovocitos de folículos de Graff que muestren un diámetro entre 0.6 – 20 mm.

Evaluar la maduración de los ovocitos sin antioxidantes y con la adición de ácido ascórbico como antioxidante.

Determinar el medio de maduración que brinda mayor eficiencia.

Capítulo II

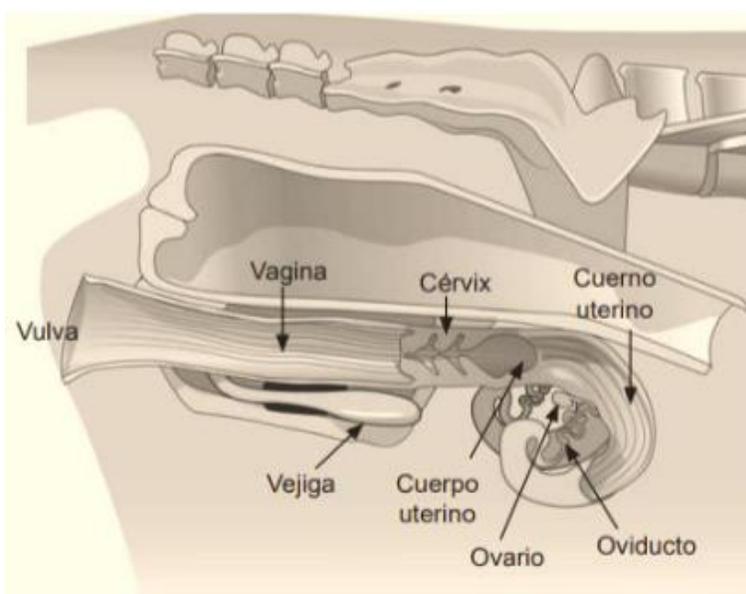
Marco teórico

Morfología del aparato reproductor de la hembra bovina

El aparato reproductor de la hembra está conformado de dos ovarios, dos oviductos, dos cuernos uterinos, un útero, cérvix, la vagina, vestíbulo y la vulva como lo indica la figura 1.

Figura 1

Fisiología del aparato reproductor bovino



Nota: El aparato reproducción femenino bovino consta de ovarios, oviductos, cuernos uterinos, útero, cérvix, vagina, vestíbulo y vulva. *Tomado de Manual de biotecnologías reproductivas y conservación de germoplasma (p.9), por Domínguez R. et al., 2020, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco*

Los **ovarios** son las gónadas femeninas que se encuentran conformados por una corteza o parte externa y una médula o parte interna. Las funciones principales de los ovarios incluyen la producción de óvulos y la producción de hormonas, principalmente, estrógenos y progesterona (Porrás & Páramo, 2009).

Los **oviductos** o Trompas de Falopio transportan los espermatozoides al lugar de la fecundación y posteriormente el óvulo fecundado al útero (Vargas & Salomé, 2018).

Los **cuernos uterinos** son estructuras cilíndricas y simétricas que tienen una longitud de 8-10 pulgadas y 2 pulgadas de diámetro dependiendo de la edad y estado fisiopatológico del animal (Puentestar, 2015).

El **útero** es el lugar en donde se lleva a cabo la gestación y es el responsable de brindar protección al feto (Puentestar, 2015). Además, es el encargado de establecer el transporte de nutrientes al feto a través de la placenta, alumbramiento del feto y la placenta (Vargas & Salomé, 2018).

El **cérvix** es una estructura en forma de esfínter que separa de forma física entre la vagina y el útero. Es el responsable de producir el moco cervical (Porras & Páramo, 2009).

La **vagina** cumple varias funciones tales como servir de receptáculo natural de semen depositado por el toro durante la monta y como vía de salida del feto al final del embarazo (Puentestar, 2015).

El **vestíbulo** mide 3-4 pulgadas de largo y está cubierto por tejido escamoso, de epitelio no queratinizado (Puentestar, 2015).

La **vulva** es la apertura externa del aparato reproductor. Sus funciones principales son: dejar pasar la orina, abrirse para recibir la monta y sirve como canal de parto (Domínguez Vidal et al., 2020)

La **vejiga** recoge líquidos para después excretarlos (Domínguez Vidal et al., 2020)

El **clítoris** contiene tejido eréctil y abundantes nervios sensoriales, es homólogo al glándula del pene en el macho (Domínguez Vidal et al., 2020)

Anatomía y fisiología del ovario

Los ovarios son las estructuras más complejas e importantes del aparato reproductor de las vacas debido a su interacción con otras glándulas y estructuras nerviosas en el cuerpo para controlar el ciclo reproductivo (Rivera, 2009).

Son órganos pares que presentan un cuerpo irregular firme, de forma ovoide que se encuentran unidos por el hilio al mesovario, el cual está adherido al ligamento ancho con el fin de mantenerse unido a la cavidad (Filipiak et al., 2016). Los ovarios en bovinos tienen un diámetro que oscila entre 3-5 cm y un peso que va desde los 14 a 17 g, estas medidas varían dependiendo del periodo del ciclo estral en el que se encuentra y de la raza (González T et al., 2017).

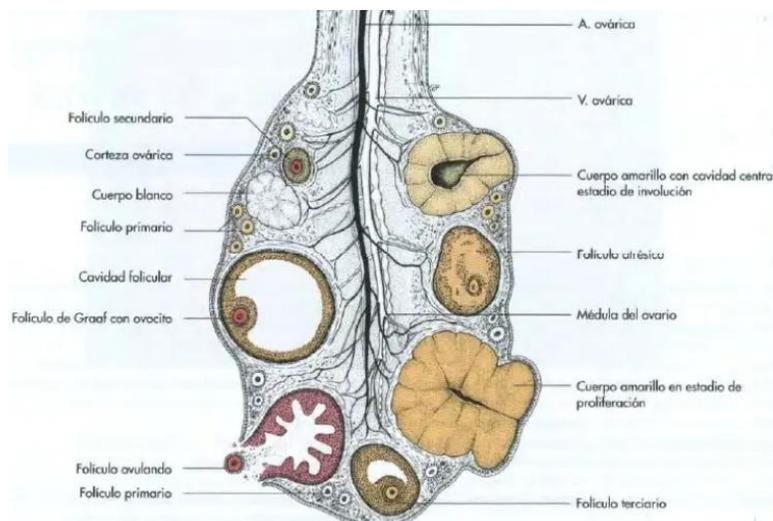
Se originan a partir de la cresta gonadal en la región lumbar y desde el saco vitelino migran las células germinales primordiales para formar eminencias ováricas que posteriormente darán lugar a los diferentes estadios de la maduración de ovocitos y de las células foliculares hasta la formación del folículo de Graaf (König & Liebich, 2008)

En la región interna de los ovarios se encuentra una médula y en la región externa una corteza densamente estructurada que está limitada por una túnica albugínea, recubierta en la superficie por un epitelio ovárico de una sola capa (König & Liebich, 2008). La médula es la porción media del ovario y es la encargada de comandar el sistema vascular y nervioso (Vargas & Salomé, 2018). En la corteza del ovario hay un gran número de formaciones funcionales, los folículos y el cuerpo amarillo o cuerpo lúteo (König & Liebich, 2008).

Entre sus funciones se encuentra la producción para la posterior liberación del óvulo y la liberación de estrógeno y progesterona, que son las hormonas encargadas de regular el ciclo estral y la gestación (Vargas & Salomé, 2018).

Figura 2

Representación esquemática del ovario de la vaca



Nota: En la figura 2 se hace una representación esquemática del ovario de una vaca en la que se presentan diferentes etapas funcionales del ciclo. Tomado de *Anatomía de los animales domésticos: Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso* (p.136), por König & Liebich, 2008, Editorial Médica Panamericana

Gametogénesis

Ovogénesis

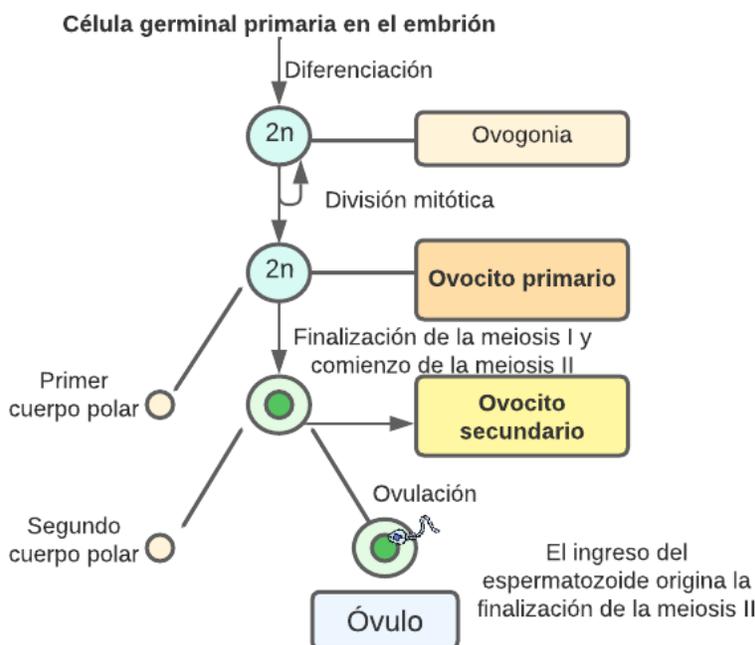
Se denomina ovogénesis al proceso de formación y desarrollo de los ovocitos; comienza con las ovogonias, que provienen de las células germinales primordiales en el embrión y termina con la formación del ovocito II (Gigli et al., 2006).

Aproximadamente, a los 82 días de gestación, comienza la división meiótica en el bovino donde los ovocitos primarios que alcanzaron la fase de folículo primordial quedan detenidos en diploteno temprano de la profase I, ovocito I conocido también como estado dictático (Cadena, 2019).

En la pubertad, cuando se produce el pico preovulatorio de LH, solo el ovocito que está contenido en el folículo preovulatorio reanuda la meiosis hasta el estadio de la metafase II y generando el ovocito secundario (Puentestar, 2015). Se forma además el cuerpo polar, en este estadio ocurre la ovulación, permaneciendo así hasta la fecundación donde se completa la meiosis (Cadena, 2019).

Figura 3

Proceso de ovogénesis



Nota: En la figura 3 se presenta un esquema del proceso de ovogénesis. Adaptado de Biología (p.974), por Campbell & Reece, 2007, Editorial Médica Panamericana

Foliculogénesis

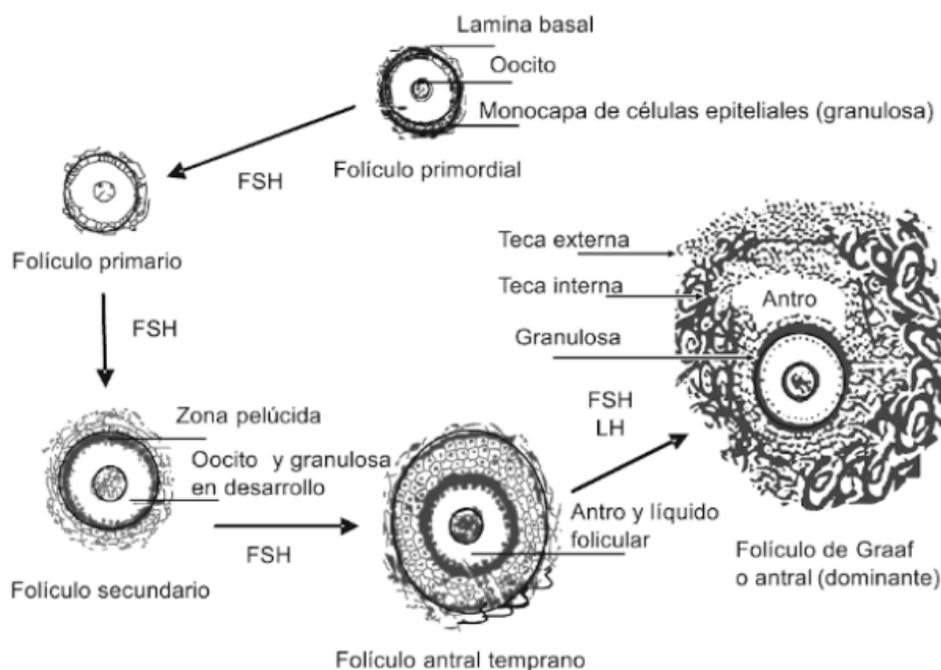
Es proceso continuo irreversible donde las células del folículo primordial inician su crecimiento y diferenciación (Puentestar, 2015). Es un proceso complejo en el que interactúan gonadotrofinas, esteroides ováricos y diversos factores (Filipiak et al., 2016). La foliculogénesis y la ovogénesis se interrelacionan ya que el folículo permite el desarrollo del ovocito de forma

que cumple con dos funciones importantes: la producción de ovocitos fecundables y el desarrollo exitoso del embrión en el útero mediante la producción de hormonas que mantienen la gestación (Castillo & Mantilla, 2020).

La foliculogénesis bovina se presenta en los periodos prepuberal, puberal, anestro postparto, ciclo estral y primeros meses de gestación (Castañeda, 2009). En los bovinos, la cantidad máxima de folículos primordiales es de 2.700.000; sin embargo, el 90% de ellos se perderá en las divisiones meióticas iniciales (Filipiak et al., 2016). Durante este proceso el folículo atraviesa por diversos estadios: folículo primordial, folículo primario, folículo secundario o preantral, folículo terciario o antral y folículo de Graaf (V. Andrade, 2020).

Figura 4

Desarrollo folicular de la hembra bovina



Nota: En la figura 4 se presenta un esquema del desarrollo folicular de la hembra bovina. Tomado de *Fisiología Animal aplicada* por Álvarez et al., 2009. Universidad de Antioquia

Clasificación de los folículos

Los **folículos primordiales** están conformados por un ovocito primario originario de las células germinales primitivas y está rodeado por una capa de células planas formadas a partir de los cordones celulares corticales (V. Andrade, 2020). El diámetro del ovocito en este estadio es de ~30 μm y el diámetro del folículo primordial es menor a 40 μm (Filipiak et al., 2016).

Los **folículos primarios** están constituidos por un ovocito que lo rodea una capa de células granulosas que le otorgan una forma cuboidal (Filipiak et al., 2016). En ellos comienza la formación de la zona pelúcida (Castillo & Mantilla, 2020).

Los **folículos secundarios** se identifican por el incremento del número de células de la granulosa mediante la mitosis y la incursión de una red de capilares entre las células que rodean al folículo para aportar nutrientes a la membrana granulosa y al ovocito (Castañeda, 2009).

El **folículo terciario** se caracteriza porque las células de la granulosa segregan líquido folicular para formar espacios entre ellas, formando el antro folicular; al mismo tiempo estas células segregan mucopolisacáridos que conforman la zona pelúcida alrededor del ovocito (Filipiak et al., 2016).

Los **folículos antrales o folículos de Graaf** son visibles en ovarios bovinos aproximadamente después de 250 días de gestación (Filipiak et al., 2016). Las células de la granulosa rodean por completo al ovocito en varias capas, manteniendo contacto con el mismo por medio de puentes citoplasmáticos denominados *cumulus oophorus* (V. Andrade, 2020). Se caracterizan por tener completamente formada la zona pelúcida y presentar una cavidad antral completamente desarrollada (Filipiak et al., 2016). El folículo de Graaf crece hasta alcanzar un diámetro de 11,2 mm el cual sucede cuando se convierte en folículo preovulatorio (Cadena, 2019).

Ciclo Estral

Los bovinos son poliéstricos con ciclos estrales que duran 17-24 días en promedio (Colazo & Mapletoft, 2017), y estos sólo se interrumpen debido a la presencia de patologías o durante la gestación .(Hernández Cerón, 2016). El periodo de celo es relativamente corto con una duración de 6 a 30 horas, siendo el único momento en el que la vaca o novilla es receptiva al macho y permite la monta (Guáqueta, 2009). El ciclo estral se encuentra regulado por las hormonas del hipotálamo (hormona liberadora de gonadotropina, GnRH), la pituitaria anterior (Hormona folículo estimulante, FSH y hormona luteinizante, LH), los ovarios (progesterona, P4; estradiol, E2 e inhibinas) y el útero (prostaglandina F2 α , PGF) (Colazo & Mapletoft, 2017).

El ciclo estral consta de cuatro etapas continuas: proestro, estro, metaestro y diestro, en donde se da lugar una serie de cambios a nivel hormonal y fisiológico para que la vaca pueda estar ciclando (Guáqueta, 2009).

Proestro

Esta etapa comienza con la lisis del cuerpo lúteo del ciclo estral anterior (Guáqueta, 2009). Se caracteriza por el desarrollo y maduración del folículo ovulatorio, teniendo una duración de dos a tres días (Hernández Cerón, 2016). Durante este tiempo se da un incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, dando como resultado, a más de la maduración final del folículo ovulatorio, el incremento de estradiol que genera el comportamiento sexual (estro) en el bovino (Colazo & Mapletoft, 2017).

Estro

En esta fase la hembra acepta la cópula durante un periodo de 8 a 18 horas (Hernández Cerón, 2016). El estro se da como resultado del incremento de los niveles de estrógenos , los cuales son los responsables del comportamiento y los signos propios del celo, aumentando las

contracciones del tracto reproductor femenino con el fin de facilitar el encuentro entre el óvulo y el espermatozoide (Guáqueta, 2009).

Metaestro

El periodo comprendido entre tres a cuatro días es conocido como metaestro (Colazo & Mapletoft, 2017). En esta etapa se da la ovulación y se desarrolla el cuerpo lúteo (Hernández Cerón, 2016). Como resultado, las concentraciones de progesterona comienzan a elevarse hasta obtener niveles mayores de 1 ng/ml de suero sanguíneo, principalmente por la influencia de la LH, indicando el fin del metaestro y el comienzo del diestro. (Hernández Cerón, 2016).

Diestro

Es la fase más larga del ciclo estral (12-14 días) y se caracteriza por la presencia de un cuerpo lúteo; por lo tanto, si la gestación no se instaura, el endometrio secreta prostaglandina dando como resultado la luteólisis e iniciando un nuevo ciclo estral (Hernández Cerón, 2016).

Clasificación de los ovocitos

Los ovocitos se clasifican en cinco categorías, según la homogeneidad, morfología del citoplasma y compactibilidad de las células del *cúmulus* (Peláez, 2011).

Categoría I.- Son ovocitos que poseen cuatro o más capas compactas de células del cúmulo, tienen una zona pelúcida bien definida y homogeneidad en el citoplasma (Rodríguez Zamora, 2013).

Categoría II.- Son ovocitos con menos de tres capas de células del *cúmulus*, citoplasma generalmente homogéneo y zona pelúcida definida (Peláez, 2011).

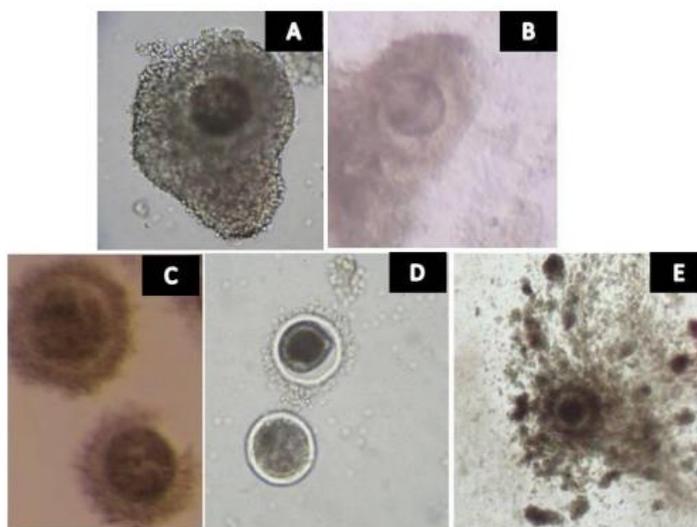
Categoría III.- Ovocitos que poseen una única capa de células del *cúmulus* y el citoplasma tiene un aspecto irregular con zonas oscuras (Peláez, 2011).

Categoría IV.- Son ovocitos desnudos, no presentan células del *cúmulus* (Rodríguez Zamora, 2013).

Categoría V.- Ovocitos madurados in vivo, con *cúmulus* expandido.

Figura 5

Categorización de ovocitos bovinos



Nota: Presentación de las cinco categorías de la clasificación de ovocitos evaluados según la compactación de las células del *cúmulus*, el grado de homogeneidad y la morfología del citoplasma. 5A: ovocito de categoría I; 5B: ovocito de categoría II; 5C: ovocito de categoría III; 5D: ovocito de categoría IV; 5E: ovocito de categoría V. *Tomado de Optimización del Método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro (p.94), por Rodríguez A., 2013. Universidad de Santiago de Compostela*

Etapas de la producción in vitro de embriones

Maduración in vitro (MIV)

La maduración del citoplasma y del núcleo de los ovocitos es primordial para la fecundación y el desarrollo embrionario (Gallego et al., 2022). La maduración nuclear se refiere a la progresión de la meiosis desde la profase I hasta metafase II donde se detiene hasta la

fertilización cuando se reanuda (Ferré et al., 2020). La maduración citoplasmática consiste en la reorganización de orgánulos, la acumulación de ARNm, proteínas y nutrientes (Gallego et al., 2022).

En bovinos, 24 h son necesarias para que el ovocito complete la maduración nuclear hasta el momento de su fertilización, donde completa la meiosis y se forman los pronúcleos (Peláez, 2011). Alrededor del 85-90% de los ovocitos inmaduros cultivados alcanzará la metafase II al final de la MIV en condiciones idóneas (Lonergan & Fair, 2016).

Fertilización in vitro (FIV)

Una vez completada la MIV, los ovocitos y espermatozoides pasan por un periodo de coincubación durante 18-24h(Gallego et al., 2022). Los espermatozoides deben tratarse con agentes de capacitación para que puedan atravesar la zona pelúcida del ovocito (Ferré et al., 2020). En bovinos, la capacitación espermática se ve favorecida por la incorporación de heparina en el medio (Peláez, 2011). El semen bovino congelado debe ser descongelado, seleccionado y capacitado antes de la FIV (Gallego et al., 2022). Los métodos de selección de semen eliminan los medios de congelación, el plasma seminal, desechos y espermatozoides muertos para seleccionar la fracción más móvil (Ferré et al., 2020)

La tasa de fecundación se mide al valor la tasa de segmentación después de 18-24 h post-inseminación y varía entre 70 % y el 85% (Ferré et al., 2020; Gallego et al., 2022).

Cultivo in vitro (CIV)

El CIV de embriones bovinos consiste en mantener el desarrollo embrionario desde el estadio de cigoto hasta blasctocisto, durante 7 días (Lonergan & Fair, 2016). El cigoto se transforma en un embrión multicelular mediante divisiones mitóticas sucesivas en un proceso llamado segmentación (Gallego et al., 2022).

Entre el 20-40% de los cigotos obtenidos de FIV alcanzarán la etapa de blastocisto (Ferré et al., 2020). El CIV es el paso más largo de todo el proceso, es el determinante en de la eficiencia global del sistema así como de la calidad de embriones obtenidos (Peláez, 2011).

Factores a considerar durante la MIV

Temperatura

La temperatura es un factor clave que puede contribuir a los efectos perjudiciales en la calidad del ovocito, especialmente en términos de maduración nuclear y tasas de división en las siguientes etapas de la FIV (Arriaga C et al., 2014). Para el mantenimiento de los ovocitos durante la recolección del matadero, se establece que una temperatura a 30-36°C es ideal ya que, por debajo de esta, se ve comprometida la capacidad de maduración del ovocito *in vitro* (Vargas & Salomé, 2018). Las temperaturas comprendidas entre 37- 41°C no perjudican el proceso de maduración *in vitro* de ovocitos (Gardón, 1999).

Soluciones y medios

La **solución de transporte** contiene solución salina (0.9% NaCl) y se le suele agregar antibióticos como kanamicina, penicilina y gentamicina (Vargas & Salomé, 2018). Los ovarios recogidos son colocados en termos que contienen esta solución para mantenerlos viables hasta la llegada en laboratorio.

La **solución dulbecco** o solución salina tamponada con fosfato de dulbecco es utilizada para enjuagar células de mamífero ya que está diseñada para mantener la integridad estructural y fisiológica de las células *in vitro* (Solmeglas, s. f.).

Para el éxito de la MIV, la elección de un **medio de cultivo** adecuado cumple un papel importante (Fesahat et al., 2017). Entre los medios más utilizados se encuentra el medio mínimo esencial (MEM) y el Tissue Culture Medium 199 (TCM) (P. M. Andrade et al., 2014).

Evaluación de ovocitos madurados.

Siguiendo la clasificación de Abdel-Halim & Helmy (2017), los ovocitos madurados se clasifican en tres categorías:

Grado I: Son ovocitos que poseen un gran potencial de desarrollo embrionario, con múltiples capas de células del *cúmulus* (más de 4) y compactas, con citoplasma homogéneo.

Grado II: Son ovocitos que poseen menos de 3 capas de *cúmulus* y un citoplasma homogéneo con áreas oscuras.

Grado III: Son ovocitos que poseen un *cúmulus* denudado con un citoplasma irregular y vacuolado.

Capítulo III

Materiales y Métodos

Ubicación del área de investigación

Ubicación política

País:	Ecuador
Provincia:	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón:	Santo Domingo
Parroquia:	Luz de América
Sector:	Hacienda “Zoila Luz”, Vía Quevedo km 24

Ubicación Ecológica

Zona de Vida:	Bosque húmedo tropical
Altitud:	224 msnm
Temperatura:	24.6°C
Precipitación:	2860mm/año
Humedad relativa:	85%
Heliofanía:	680 horas luz/año
Suelo:	Franco Arenoso

Ubicación Geográfica

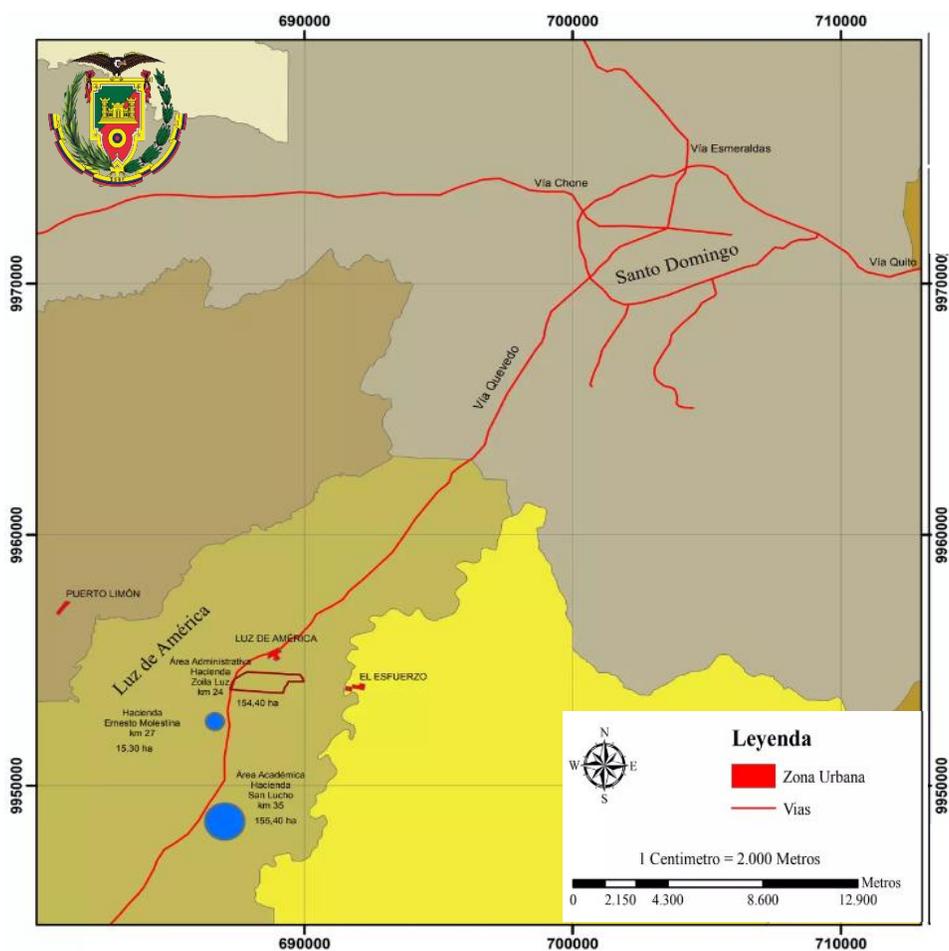
El presente trabajo se realizó en el vit, ubicado en la Hacienda Zoila Luz, Vía Santo Domingo-Quevedo km 24.

Latitud: 00° 24' 44"

Longitud: 79 ° 18' 32"

Figura 7

Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación



Materiales

Transporte de ovarios del matadero

Tabla 1

Recursos necesarios para el transporte de ovarios del matadero

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Cooler	Vaso de precipitación (500mL)	Agua destilada	Ovarios
Balanza analítica	Vaso de precipitación (250mL)	NaCl	
Plancha de agitación	Micropipeta Puntas de micropipetas	Penicilina/ Estreptomicina	
Termómetro	Papel aluminio		

Aspiración de ovocitos

Tabla 2

Recursos necesarios para la aspiración de ovocitos

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Balanza analítica	Vaso de precipitación	NaCl	Ovarios
Plancha de agitación	Probeta (100mL) Micropipeta	KCl KH ₂ PO ₄	
Platina térmica	Puntas de micropipetas	Na ₂ HPO ₄	
Agitador magnético	Agujas hipodérmicas 18G	MgCl ₂ •6H ₂ O	
Baño María	Jeringa 10 mL Placas Petri	CaCl ₂ •2H ₂ O Glucosa	

Guantes	Piruvato de sodio
Rotulador	BSA
Gradilla	Gentamicina

Maduración de ovocitos

Tabla 3

Recursos necesarios para la maduración de ovocitos

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Platina térmica	Vaso de precipitación	Agua destilada ultra pura	Ovocitos
Estereomicroscopio	Micropipeta	Invitrogen	
Incubadora	Puntas de micropipetas	NaCl, KCl	
Autoclave	Placas Petri	KH_2PO_4 , Na_2HPO_4	
Estufa	Guantes	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
Cámara de flujo laminar	Placas Nunc	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Baño María	Filtro 0,2 mm	Glucosa	
	Tubos falcón	Piruvato de sodio	
	Tubos eppendorf	BSA	
	Balón de aforo	Gentamicina	
		TCM 199 1x	
		MEM 10X	
		Suero de ternera SFB	
		LH, FSH	
		Ácido Ascórbico	

Preparación de las soluciones y medios requeridos

Preparación de la solución de lavado de ovarios

En un vaso de precipitación que contenía 500 mL de agua destilada se agregó 8.5 g NaCl, 80 μ L de penicilina/estreptomicina (Gibco) y se aforó hasta 1 000 mL.

Preparación de la solución Dulbeco

En un vaso de precipitación que contenía 50 mL de agua destilada ultra pura, se disolvieron 1.2 g NaCl, 30 mg KCl, 30 mg KH_2PO_4 y 0.17 mg Na_2HPO_4 . Luego, en otro vaso de precipitación que contenía 50 mL de agua destilada ultra pura, se disolvieron 15 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 19.8 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A continuación, el contenido del vaso de precipitación 2 se adicionó en el vaso de precipitación 1.

Se añadió 150 mg de glucosa y 5.4 mg de piruvato de sodio en la solución y se aforó hasta 150 mL. Esta se denominó como solución madre de Dulbeco.

Preparación de la solución Dulbeco enriquecida

Se tomó 100 mL de la solución madre de Dulbeco, se añadió BSA 3% y se dejó que se disuelva lentamente. Se colocaron 100 μ L de gentamicina y la solución se filtró en filtro miliport de jeringa de 0.2 μ m.

Preparación de los medios de maduración de ovocitos

En un tubo falcón se adicionó 9mL de TCM 199 1x, 1 mL de suero de ternera SFB, 10 μ L de piruvato 0.2 Mm, 10 μ L de LH y 15 μ L de FSH. Se coló el medio por un por un filtro de jeringa de 0.2 μ m y se la llevó a la incubadora 2 h antes de iniciar el proceso de maduración.

Para el segundo medio de maduración, se reemplazó el TCM 199 1x por el medio MEM 10x. Luego, se adicionaron las mismas cantidades que el medio anterior.

Traslado de los ovarios del matadero

Los ovarios fueron transportados en un cooler y con el fin de mantener la temperatura entre 36-38°C, se adicionó agua caliente en el interior del cooler. La solución de transporte se colocó en una bolsa plástica estéril a 36 °C y con un termómetro se midió los cambios de temperatura.

Preparación de ovarios para la aspiración de ovocitos

Teniendo los ovarios en el laboratorio se colocaron en vasos de precipitación que contenían solución de lavado previamente temperado a 36°C.

A continuación, con una jeringa de 10 mL y aguja hipodérmica de 18G', se tomaron 2mL de la solución de Dulbecco enriquecida que estaba previamente temperada a 36 °C y se realizó la aspiración de los folículos. El contenido de la jeringa era colocado en una caja Petri que estaba sobre una platina térmica.

Lavado de ovocitos

Se prepararon tres cajas Petri que contenían Dulbecco enriquecido y se las colocó sobre la platina térmica.

El contenido de la aspiración de los ovocitos se llevó al estereomicroscopio y con una micropipeta calibrada en 25 µL, se seleccionaron los ovocitos y se colocaron en una de las cajas Petri que contenían Dulbecco enriquecido. Este proceso se realizó tres veces.

Maduración de ovocitos

Previo a la práctica se realizó la limpieza de la cámara de flujo laminar con alcohol al 70% y prendiendo la luz UV por 10 min.

Se preparó la placa Nunc, agregando 500 μ L de medio de maduración TCM 199 1x en el primer pocillo y 500 μ L de medio de maduración MEM 10X en el segundo pocillo. En el pocillo 3 se adicionó la combinación 500 μ L del medio de maduración TCM 199 1x+ 5mM/mL de ácido ascórbico y en el pocillo 4 se adicionó la combinación MEM 10X + 5mM de ácido ascórbico. La cantidad de ácido ascórbico utilizada se la obtuvo de (Dalvit et al., 2005).

En cada pocillo se colocó un máximo de 25 ovocitos y se adicionó 500 μ L de aceite mineral.

Evaluación de ovocitos

Una vez colocados los ovocitos en la placa Nunc, se los llevó a la incubadora y se dejó madurar por 24 h; se realizó el conteo de cada pocillo y se los categorizó en I, II y III (Abdel-Halim & Helmy, 2017).

Diseño experimental

Factores del experimento

Tabla 4

Factores y niveles a probar en el trabajo de experimentación

Factores	Simbología	Niveles
Medios de maduración (A)	a0	TCM 199 1x
	a1	MEM 10X
Concentración de ácido ascórbico (B)	b0	Control
	b1	5mM

Tratamientos a comparar

Tabla 5

Tratamientos a comparar en el trabajo de experimentación

N° tratamiento	Interacciones	Unidades Experimentales
T1	a0b0	TCM 199 1x + Control
T2	a0b1	TCM 199 1X + 5 mM
T3	a1b0	MEM 10X + Control
T4	a1b1	MEM 10 X+ 5mM

Tipo de diseño

Para el análisis estadístico de este estudio se utilizó un ANOVA DBCA con arreglo factorial AxB, donde el factor A corresponde a los medios de maduración y el factor B a la concentración de ácido ascórbico.

Repeticiones

Se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento, obteniendo un total de 16 unidades experimentales.

Análisis funcional

Para evaluar los resultados significativos de cada variable analizada en el estudio se aplicó una prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Capítulo IV

Resultados

Se utilizaron 252 ovarios de vacas faenadas y se recuperaron 512 ovocitos viables de los cuales, se obtuvo una maduración del 84.57%. Se tuvo un promedio de recuperación de 2.03 ovocitos por ovario. Se registró el número de ovarios y ovocitos utilizados durante la experimentación, tomando en cuenta los parámetros ideales para el proceso de maduración *in vitro* como se detalla en la tabla 6.

Registro de ovarios y ovocitos utilizados

Tabla 6

Registro de ovarios y ovocitos utilizados durante la experimentación.

N° R	N° Ovarios	Medios de maduración	TCM 199 1X			MEM 10 X			TCM 199 1X +5mM Á.A			MEM 10X +5mM Á.A		
			I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
		N° ovocitos seleccionados												
1	90	180	26	15	2	1	6	12	24	19	3	8	10	6
2	56	100	6	10	7	5	15	1	12	13	2	6	11	3
3	54	120	15	11	1	11	14	2	15	12	1	11	11	2
4	52	112	17	10	2	9	13	1	14	11	2	10	12	2
Sub Total:			64	46	12	25	45	16	65	55	8	35	44	13
Total	252	512	122			86			128			92		

Categorización ovocitaria

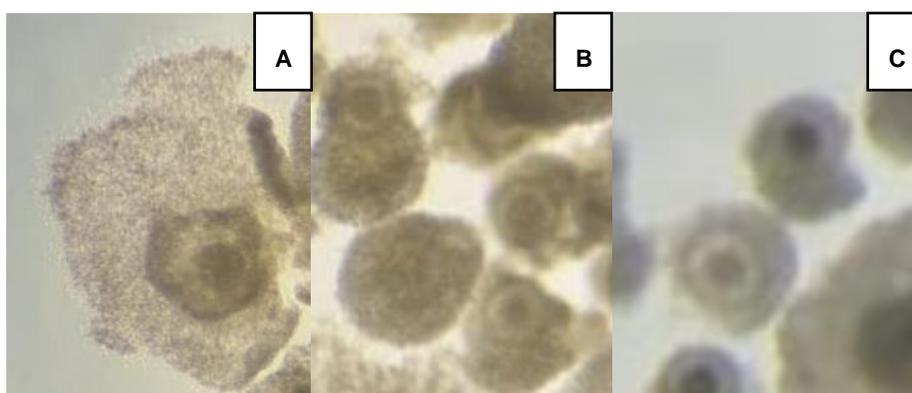
Grado I: Son ovocitos que poseen un gran potencial de desarrollo embrionario, con múltiples capas de células del *cúmulus* (más de 4) y compactas, con citoplasma homogéneo (Abdel-Halim & Helmy, 2017) .

Grado II: Son ovocitos que poseen menos de 3 capas de *cúmulus* y un citoplasma homogéneo con áreas oscuras (Abdel-Halim & Helmy, 2017).

Grado III: Son ovocitos que poseen un *cúmulus* desnudo con un citoplasma irregular y vacuolado (Abdel-Halim & Helmy, 2017).

Figura 8

Clasificación de los ovocitos madurados

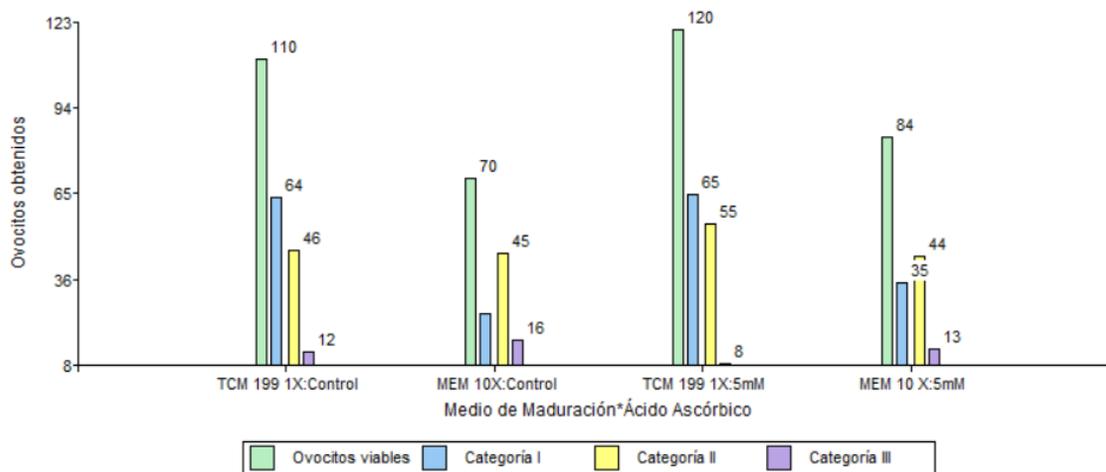


Nota: Se presenta el criterio de clasificación de los ovocitos madurados. A: Ovocito de Grado I; B: Ovocitos de grado II y C: Ovocitos de grado III. Fuente: Elaboración propia

Evaluación de maduración de ovocitos en cada tratamiento

Figura 9

Resumen de la cantidad de ovocitos madurados



En la figura 9 se presenta la cantidad de ovocitos madurados con cada tratamiento. En el tratamiento 1 se obtuvieron 110 ovocitos viables de los cuales 64 eran de categoría I, 46 de categoría II, y 12 de categoría III. Para el tratamiento 2 se consiguieron 70 ovocitos viables, de ellos 25 eran de categoría I, 45 de categoría II y 16 de categoría III. Al utilizar el tratamiento 3 se lograron conseguir 120 ovocitos viables de los cuales 65 eran de categoría I, 55 de categoría II y 8 de categoría III. En el tratamiento 4 se obtuvieron 84 ovocitos viables, de ellos 35 eran de categoría I, 44 de categoría II y 3 de categoría III.

Tabla 7

Análisis de varianza de la maduración de ovocitos viables

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medio de maduración	462.25	1	370.563	5.89	0.0319
B: Concentración Á.A	0.25	1	14.0625	0.22	0.6448
INTERACCIONES					
A*B	6.25	1	1.5625	0.07	0.8774
RESIDUOS	1019.0	12	62.8958		
TOTAL	1487.75	15			

En la tabla 7 se muestra el análisis de varianza de la maduración de ovocitos viables usando dos medios de maduración y con distintas concentraciones de ácido ascórbico, en el que se identificó diferencia significativa para el factor A (Medio de Maduración). Mientras que para el factor B (Concentración de ácido ascórbico) y la interacción A*B (Medio de Maduración/ Concentración de ácido ascórbico) no mostraron diferencia significativa.

Tabla 8

Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría I

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medio de maduración	342.25	1	289.0	9.62	0.0092
B: Concentración A.A.	2.25	1	6.25	0.21	0.6564
INTERACCIONES					
A*B	4.0	1	40.0	0.02	0.8794
RESIDUOS	360.5	12	30.0417		
TOTAL	659.75	15			

En la tabla 8 se muestra el análisis de varianza de la maduración de ovocitos madurados de categoría I usando dos medios de maduración y con distintas concentraciones de ácido ascórbico, en el que se identificó diferencia significativa para el factor A (Medio de Maduración). Mientras que para el factor B (Concentración de A.A.) y la interacción A*B (Medio de Maduración/ Concentración de A.A.) no mostraron diferencia significativa, lo que indica normalidad en los datos.

Tabla 9

Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría II

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medio de maduración	5.0625	1	5.0625	0.56	0.8993
B: Concentración A.A.	1.5625	1	1.562	0.17	0.7049
INTERACCIONES					

A*B	10.5625	1	10.5625	1.18	0.8004
RESIDUOS	107.75	12	8.97917		
TOTAL	124.938	15			

En la tabla 9 se muestra el análisis de varianza de la maduración de ovocitos madurados de categoría II usando dos medios de maduración y con distintas concentraciones de ácido ascórbico, en el que se identificó que no había diferencia significativa con los factores y con las interacciones.

Tabla 10

Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría III

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medio de maduración	27.5625	1	27.5625	1.66	0.2213
B: Concentración A.A.	0.0625	1	0.0625	0.00	0.9520
INTERACCIONES					
A*B	0.0625	1	0.0625	0.07	0.9520
RESIDUOS	198.75	12	16.5625		
TOTAL	183.0	15			

En la tabla 10 se muestra el análisis de varianza de la maduración de ovocitos usando dos medios de maduración y con distintas concentraciones de ácido ascórbico, no hubo diferencias significativas con los factores y con las interacciones.

Prueba de significación de Tukey para los factores de estudio

Resultados de estudio para los medios de maduración (Factor A)

Tabla 11

Resultados de la prueba de Tukey para el factor A

Factor A (Medios de Maduración)	Ovocitos madurados viables	Categoría I	Categoría II	Categoría III
TCM 199 1x	28.75 ^A	16.13 ^A	12.3 ^A	2.5 ^A
MEM 10 X	19.13 ^B	7.63 ^B	11.5 ^A	2.375 ^A

Nota: Ovocitos madurados viables hace referencia a la suma de ovocitos de categoría I y II.

En la tabla 11, se observa que el medio de maduración TCM 199 1X permitió obtener un mayor número de ovocitos madurados viables totales y de ovocitos madurados de categoría I.

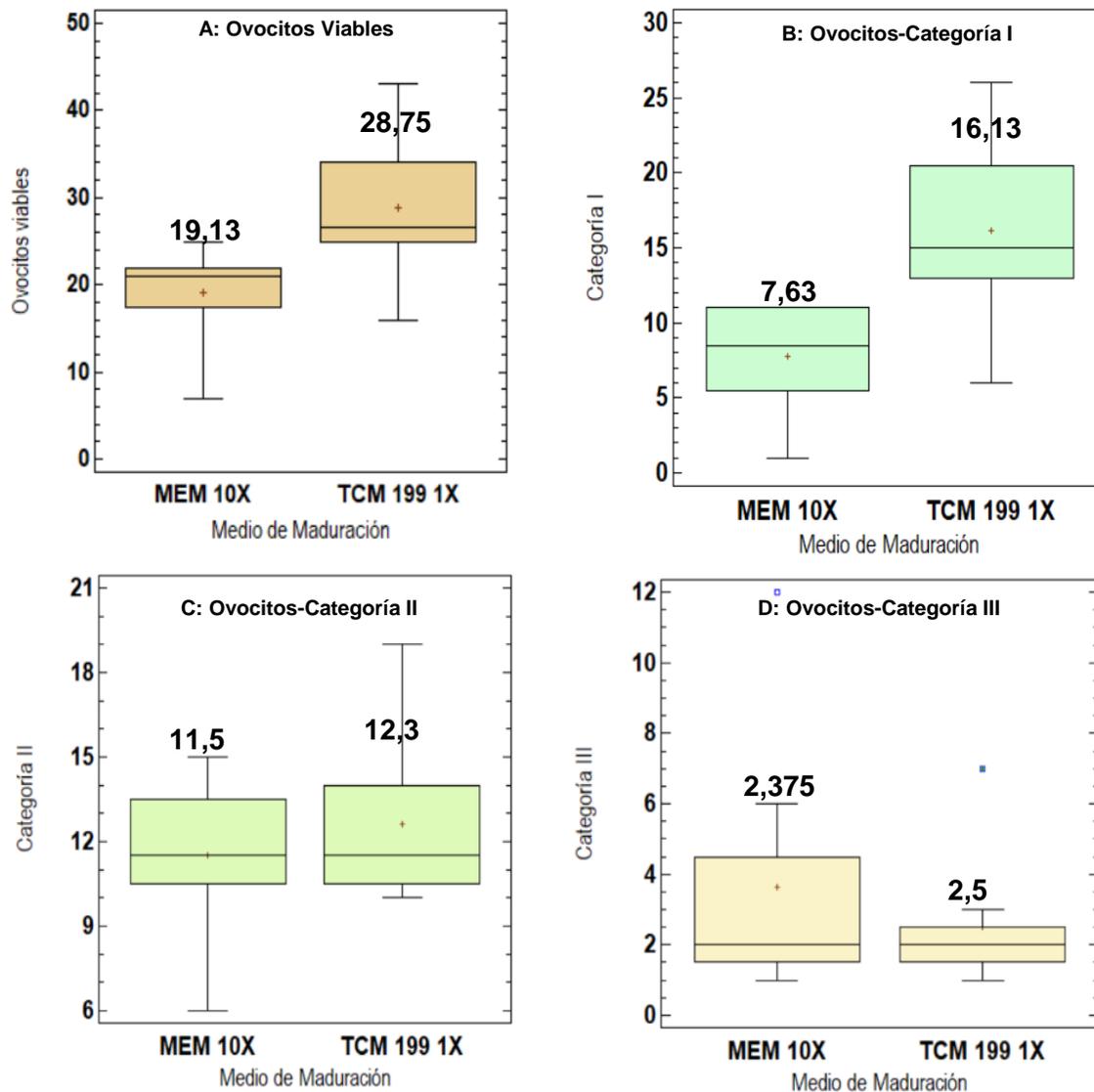
El medio de maduración TCM 199 1X aumentó el porcentaje de maduración, obteniendo 28.75 ovocitos madurados viables totales y 16.13 ovocitos de categoría I. El uso del medio MEM 10X redujo el porcentaje de maduración de ovocitos, reflejando un valor de 19.13 ovocitos madurados viables, de los cuales se obtuvo 7.63 ovocitos de categoría I.

En el caso de ovocitos madurados de categoría II, no se obtuvieron diferencias significativas, pudiendo obtener 12.3 ovocitos con el medio TCM 199 1X y 11.5 con el medio MEM 10X.

El uso de los distintos medios no presentó diferencia significativa para los ovocitos madurados de categoría III, permitiendo obtener 2.5 ovocitos con el medio TCM 199 1X y 2.375 ovocitos con el medio MEM 10X.

Figura 9

Estudio del efecto de los medios de maduración (Factor A) en las variables de estudio



Nota: Las gráficas representan el efecto de los medios de maduración (Factor A) sobre las variables de estudio. Figura 9A: cantidad de ovocitos madurados viables; 9B: cantidad de ovocitos madurados de categoría I; 9C: cantidad de ovocitos madurados de categoría II; 9D: cantidad de ovocitos madurados de categoría III.

Tabla 12

Resultados de la prueba de Tukey para el factor B

Factor B (Concentración de Ácido Ascórbico)	Ovocitos madurados viables totales	Categoría I	Categoría II	Categoría III
Control	23.00 ^A	11.25 ^A	11.75 ^A	2.25 ^A
5mM	24.88 ^A	12.50 ^A	12.38 ^A	2.63 ^A

En la tabla 12, se observa que la adición de ácido ascórbico no logró modificar el porcentaje de maduración ovocitaria. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la cantidad de ovocitos viables madurados ni en los ovocitos madurados de categoría I, II y III.

Tabla 13

*Resultados de la prueba de Tukey para la interacción A*B*

Interacción A*B	Ovocitos madurados viables totales	Categoría I	Categoría II	Categoría III
TCM 199 1X+ Control	27.50 ^A	16.00 ^A	11.50 ^A	27.50 ^A
TCM 199 1X + 5mM Á.A	30.00 ^A	16.25 ^A	13.75 ^A	30.00 ^A
MEM 10X + Control	18.50 ^A	6.50 ^A	12.00 ^A	18.50 ^A
MEM 10X + 5mM Á.A	19.75 ^A	8.75 ^A	11.00 ^A	19.75 ^A

En la tabla 13, se observa que ninguna de las interacciones logró modificar el porcentaje de maduración ovocitaria por lo que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la cantidad de ovocitos viables ni en los ovocitos madurados de categoría I, II y III.

Capítulo V

Discusión

La tasa de recuperación de ovocitos por ovario fue de 2.03 fue baja en comparación a otros reportes de 10.0 (Quispe E et al., 2018), 15-20 (Domínguez Vidal et al., 2020) y 5 (Bouhier, 2016). Existen muchos factores que influyen en la cantidad de ovocitos recolectados como la edad de la donante, etapa del ciclo estral y estado nutricional (Aguila et al., 2020). Factores como el número de aguja de punción, la frecuencia con que se aspira y el tamaño de los folículos aspirados también pueden influir en el número de ovocitos recolectados (Quispe E et al., 2018). Bajo este precepto es que solo se recolectaron ovocitos por aspiración cuyos folículos eran iguales o mayores a 2 mm hasta 20 mm. Los ovocitos bovinos adquieren competencia cuando el folículo alcanza los 3 mm y el efecto del tamaño es relevante cuando el folículo llega a los 8mm (Aguila et al., 2020). Durante la maduración *in vitro* (MIV) culminan con su desarrollo y llegan al estadio de metafase (II), donde adquieren competencia genética y citoplasmática (Salgado-Cruz et al., 2020).

La relación entre ovocitos viables e inadecuados por ovario se encuentra influenciada por 3 variables: la recogida y transporte de ovarios, los métodos e instrumentación utilizados para la obtención de los ovocitos y los adecuados criterios de selección (Brackett & Zuelke, 1993). La morfología de los complejos cúmulo-ovocito (COC) es el criterio más común utilizado para seleccionar y clasificar ovocitos bovinos(Aguila et al., 2020). Es por ello que se utilizaron ovocitos de grado 1 y 2 para someterlos al proceso de maduración, mientras que los grados 3,4 y 5 fueron descartados.

La selección de un medio de cultivo adecuado cumple un papel muy importante, ya que las bajas tasas de maduración de ovocitos se consideran complicaciones importantes para las

siguientes fases de la producción *in vitro* (Fesahat et al., 2017). El medio más ampliamente utilizado para la maduración *in vitro* es el TCM-199 (Medeiros de Araujo et al., 2009).

En este estudio, el medio de maduración TCM 199 1x aumentó el porcentaje de maduración, obteniendo 28.75 ovocitos madurados viables y 16.13 ovocitos de categoría I. Medeiros y col. (2009) indicaron que obtuvieron una mayor tasa de maduración (81,9%) utilizando este medio ya que tiene una mayor riqueza de nutrientes, siendo mejor para la maduración. El medio TCM 199 presenta un efecto en la maduración que da como resultado una mayor división celular, por tanto, permite obtener un mejor desarrollo embrionario a diferencia de otros medios (Gandhi et al., 2000).

En el presente estudio, el ácido ascórbico no produjo diferencia significativa en la maduración de los ovocitos. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Kere et. al (2013) y Córdova et. al (2010) quienes establecen que la adición de vitamina C al medio de maduración de ovocitos no generó ningún efecto sobre la maduración de los ovocitos bovinos.

Sin embargo, Miclea y Zahan (2021) mostró que el ácido ascórbico mejora las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos porcinos. La variabilidad de los resultados viene dada por la especie animal, el tiempo de exposición y las concentraciones empleadas (García Díaz et al., 2013).

Aunque no hubo diferencia significativa en el porcentaje de maduración por parte de los tratamientos, se observa que el tratamiento 2 (TCM 199 1x/5mM ácido ascórbico) permite obtener un mayor porcentaje de maduración, consiguiendo 30 ovocitos viables de los cuales 16.25 son de categoría I.

Capítulo VI

Conclusiones

La adición de una concentración baja de ácido ascórbico durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos no mejoró la maduración ni su desarrollo.

El uso del medio TCM 199 1X permitió obtener una mayor cantidad de ovocitos madurados viables.

El uso del medio TCM 199 con 5 mM Ácido ascórbico mejoró mínimamente la maduración de ovocitos bovinos.

Recomendaciones

Determinar la influencia del ácido ascórbico en las siguientes etapas de la producción *in vitro* de embriones.

Evaluar el efecto del ácido ascórbico en relación con otras sustancias antioxidantes.

Capítulo VII:

Bibliografía

Abdel-Halim, B., & Helmy, N. (2017). Effect of nano-selenium and nano-zinc particles during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Animal Production Science*, 58. <https://doi.org/10.1071/AN17057>

Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte Selection for In Vitro Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 10(12), 2196. <https://doi.org/10.3390/ani10122196>

Andrade, P. M., Chaves, R. N., Rodrigues, A. P. R., Campello, C. C., Gastal, E. L., & Figueiredo, J. R. (2014). *Effects of α -MEM and TCM-199 culture media and epidermal growth factor on survival and growth of goat and sheep preantral follicles cultured in vitro.*

Andrade, V. (2020). *Evaluación del efecto de la cianocobalamina sobre el desarrollo de ovocitos recuperados de ovarios de bovinos post mortem de centros de faenamiento, en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.* Universidad Técnica de Cotopaxi.

Arriaga C, I., Huanca L, W., Terreros C, M., Becerra G, J. J., García H, P., & Ampuero B, A. (2014). Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División in vitro de Ovocitos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4), 477-486. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10783>

Bouhier, M. (2016). *Categorización de estructuras ováricas: Relación con el porcentaje de recuperación ovocitaria, maduración y desarrollo embrionario in vitro en la especie bovina.* Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias.

Universidad Católica Argentina.

<https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/275/1/doc.pdf>

Brackett, B. G., & Zuelke, K. A. (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39(1), 43-64. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90023-X)

Cadena, G. (2019). *Análisis de morfología ovocitaria en bovinos de razas lecheras de hatos sobre 2800 msnm, obtenidos de ovarios de matadero del cantón Quito* [Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/20589/1/T-UCE-0014-MVE-091.pdf>

Castañeda, L. (2009). *Fisiología de la reproducción bovina: Desde la fecundación hasta la implantación embrionaria* [Universidad de La Salle]. https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1312&context=medicina_veterinaria

Castillo, J., & Mantilla, H. (2020). *Evaluación de la calidad de ovocitos ovinos obtenidos mediante aspiración folicular empleando cuatro presiones de vacío*. Universidad de Santander.

Colazo, M. G., & Mapletoft, R. (2017). Fisiología del ciclo estral bovino. *Ciencia Veterinaria*, 16(2), Art. 2. <https://doi.org/10.19137/cienvet20141623>

Córdova, B., Morató, R., Izquierdo, D., Paramio, T., & Mogas, T. (2010). Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology*, 74(8), 1341-1348. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.003>

Covelo, I., Puente, M. A., & Tartaglione, C. M. (2021). Influence of Follicular Fluid on in Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes. *Open Journal of Animal Sciences*, 12(1), Art. 1. <https://doi.org/10.4236/ojas.2022.121009>

Dalvit, G., Llanes, S., Descalzo, A., Insani, M., Beconi, M., & Cetica, P. (2005). Effect of Alpha-Tocopherol and Ascorbic Acid on Bovine Oocyte in Vitro Maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(2), 93-97. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00522.x>

Domínguez Vidal, R. I., Sánchez Hernández, F. E., & López Gómez, J. J. (2020). *Manual de biotecnologías reproductivas y conservación de germoplasma*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Fernández Reyes, F., Hernández Pichardo, J. E., & Reyes Flores, M. del C. (2010). Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal*, 32(2), 78-83.

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

Fesahat, F., Dehghani Firouzabadi, R., Faramarzi, A., & Khalili, M. A. (2017). The effects of different types of media on in vitro maturation outcomes of human germinal vesicle oocytes retrieved in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 44(2), 79-84. <https://doi.org/10.5653/cerm.2017.44.2.79>

Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202), 2-2.

Gallego, F., Mancheno, A., Mena, L., & Murillo, A. (2022). Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.*, 172-185. <https://doi.org/10.18502/epoch.v2i2.11192>

Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K., & Krisher, R. L. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction*, 15(2), 395-401. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.2.395>

García Díaz, J., Romero-Aguirregomezcorta, J., Blanco, S., & Ruiz, S. (2013). Adición de sustancias antioxidantes en los medios de cultivo empleados en la producción in vitro de embriones en mamíferos. *Revista de Salud Animal*, 35, 10-19.

Gardón, J. (1999). *Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización in vitro* [Universidad de Córdoba].
<https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/407/13079219.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Gigli, I., Russo, A., & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*, 8(1), 183-203.

González-Figueroa, H., & Molfino, H. M. G. (2005). Biotecnología reproductiva: Una alternativa para mejorar la producción animal. *Biotempo*, 5, 5-11.
<https://doi.org/10.31381/biotempo.v5i0.886>

González T, M., De La Rosa T, E., & Mendoza M, C. (2017). Morfometría macroscópica del cuerpo lúteo de vacas cebú gestantes y no gestantes en el trópico colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(2), 190-197.
<https://doi.org/10.24188/recia.v9.n2.2017.556>

Guáqueta, H. (2009). Ciclo Estral: Fisiología Básica Y Estrategias Para Mejorar La Detección De Celos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56(III), 163-183.

Hernández Cerón, J. (2016). *Fisiología Clínica de la Reproducción de Bovinos Lecheros*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. <https://doi.org/10.22201/fmvz.9786070286902e.2016>

Kere, M., Siriboon, C., Lo, N.-w., Nguyen, N. T., & Ju, J.-C. (2013). Ascorbic Acid Improves the Developmental Competence of Porcine Oocytes After Parthenogenetic Activation and Somatic Cell Nuclear Transplantation. *The Journal of Reproduction and Development*, 59(1), 78-84. <https://doi.org/10.1262/jrd.2012-114>

König, V., & Liebich, M. (2008). *Anatomía de los animales domésticos: Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso* (Vol. 2). Editorial Médica Panamericana.

Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 255-268. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>

Medeiros de Araujo, C. H., Nogueira, D., de Araujo, M. C. P. M., de Paula Martins, W., Ferriani, R. A., & dos Reis, R. M. (2009). Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. *Fertility and Sterility*, 91(2), 509-513. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.082>

Miclea, I., & Zăhan, M. (2021). Combinations of Trolox and ascorbic acid have a beneficial effect on in vitro maturation of pig oocytes. *Czech Journal of Animal Science*, 66(9), 359-367. <https://doi.org/10.17221/253/2020-CJAS>

OIE. (2022). *Código Sanitario para los animales terrestres* (Vol. 1). Organización Mundial de Sanidad Animal.

Peláez, V. (2011). *Producción in vitro de embriones bovinos*. Universidad de Cuenca.

Pioltine, E. M., Costa, C. B., Barbosa Latorraca, L., Franchi, F. F., dos Santos, P. H., Mingoti, G. Z., Paula-Lopes, F. F. de, & Nogueira, M. F. G. (2021). Treatment of in vitro-Matured Bovine Oocytes With Tauroursodeoxycholic Acid Modulates the Oxidative Stress Signaling Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.623852>

Porras, A., & Páramo, R. (2009). *Manual de Prácticas de Reproducción Animal* (1.ª ed.). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Puentestar, F. (2015). *Evaluación de la supereovulación con la hormona gonadotropina menopáusica humana en bovinos, en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi* [Universidad Técnica de Cotopaxi]. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2877/1/T-UTC-00401.pdf>

Quispe E, C., Ancco G, E., Solano A, J., Unchupaico P, I., & Mellisho S, E. (2018). Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1114-1121.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418>

Rivera, H. (2009). *Revisión anatómica del aparato reproductor de las vacas*. Miniapoles Dairy Cattle Reproduction Conference.

Rodríguez Zamora, L. A. (2013). *Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro*. <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/9213>

Salgado-Cruz, E., Lopera-Vásquez, R., 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://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17138>

Solmeclas. (s. f.). Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) w/o Calcium w/o Magnesium. *Productos y Servicios para Salas blancas y Laboratorios-SOLMEGLAS*.

Recuperado 17 de febrero de 2023, de <https://solmeclas.com/producto/dulbeccos-phosphate-buffered-saline-dpbs-w-o-calcium-w-o-magnesium/>

Vargas, E., & Salomé, P. (2018). *Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes* [Universidad Politécnica Salesiana].

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