



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA



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

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

Autora:

Cobos Velasco Ana Karelis

Director:

Carrera Garcés Fredy Patricio Ph.D.



Introducción



Producción *in vitro* de embriones (PIV)

Alternativa para obtener embriones a bajo coste

Maduración *in vitro* (MIV)

Fertilización *in vitro* (FIV)

Cultivo *in vitro* (CIV)

Etapas de la PVI

Recuperación de ovocitos

Donantes vivas

Donantes sacrificadas

Aspiración de los folículos de los ovarios o a través de cortes en la superficie del ovario

Fuente más económica

Selección de ovocitos

La calidad del ovocito es el factor principal que determina el rendimiento del blastocisto

Factores que se consideran

Aspecto del citoplasma, tamaño del ovocito y células del *cúmulus* que lo envuelven



La MIV es uno de los principales pasos determinantes en la producción *in vitro*

Temperatura de transporte, tiempo de maduración y hormonas pueden repercutir la posibilidad de maduración de los ovocitos (Covelo et al., 2021)

Objetivos

General

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

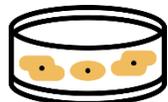
Específicos



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

Diseño experimental

Factores y niveles de experimentación

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

Tratamientos a comparar

N°	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

ANOVA DBCA con arreglo factorial AxB

4 repeticiones para cada tratamiento= 16 UE

Prueba de significancia de Tukey ($p < 0,05$)

Metodología

Traslado de ovarios hasta el laboratorio



Solución de transporte a 36 °C



Lavado de ovarios

Aspiración de ovocitos



Solución de dulbecco y de transporte temperada



Medición del tamaño de los folículos

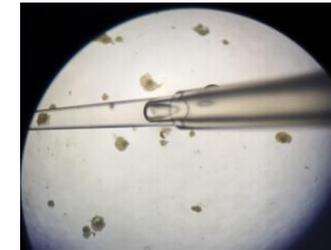


Jeringa de 10 mL y aguja hipodérmica 18G

Lavado y selección de ovocitos



Con una micropipeta calibrada en 25 μ L



Selección de ovocitos



COC I



COC II

Metodología

Maduración de ovocitos



Medios de maduración
TCM 199 y MEM
preparados 2 h antes



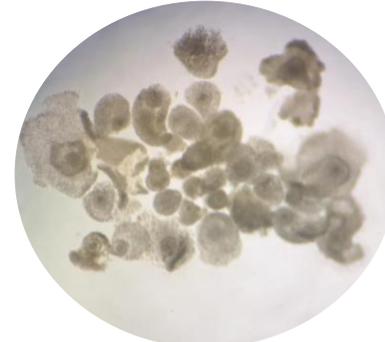
Adición de los medios,
ovocitos y ácido
ascórbico en la placa



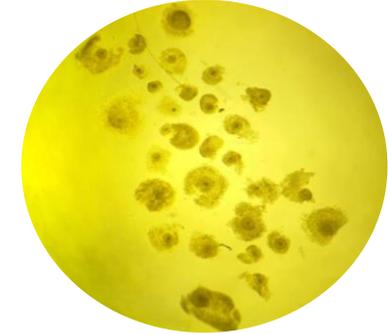
Incubar por 24 h,
36°C, 5 CO₂%



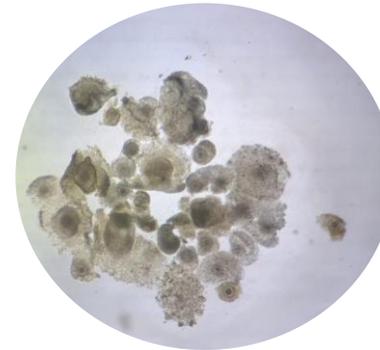
Evaluación de ovocitos



TCM 199 1x + Control



MEM 10X + Control



TCM 199 1X + 5 mM A.A



MEM 10 X+ 5mM A.A

Variables de estudio

Ovocitos de grado I

Múltiples capas de células del *cúmulus* (más de 4) y compactas, con citoplasma homogéneo

Ovocitos de grado II

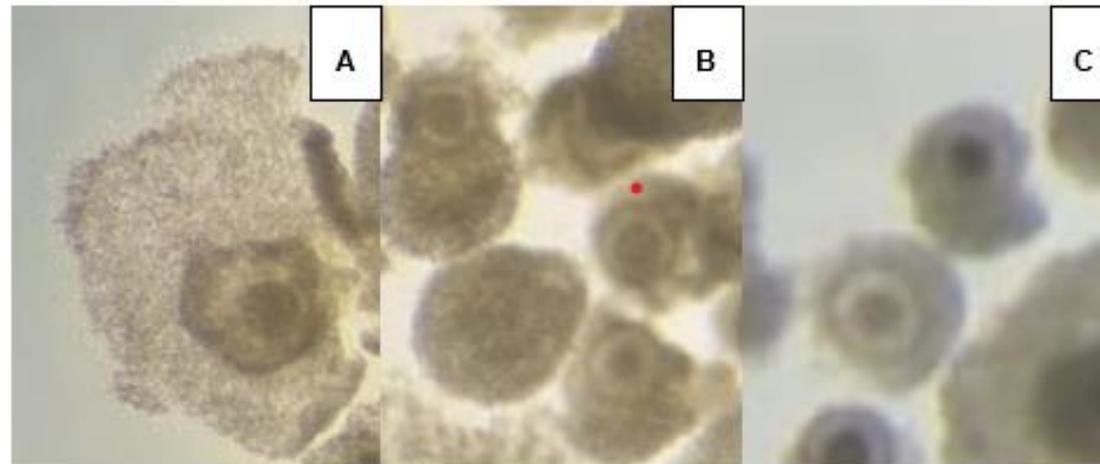
Poseen menos de 3 capas de *cúmulus* y un citoplasma homogéneo con áreas oscuras

Ovocitos de grado III

Poseen un *cúmulus* desnudo con un citoplasma irregular y vacuolado

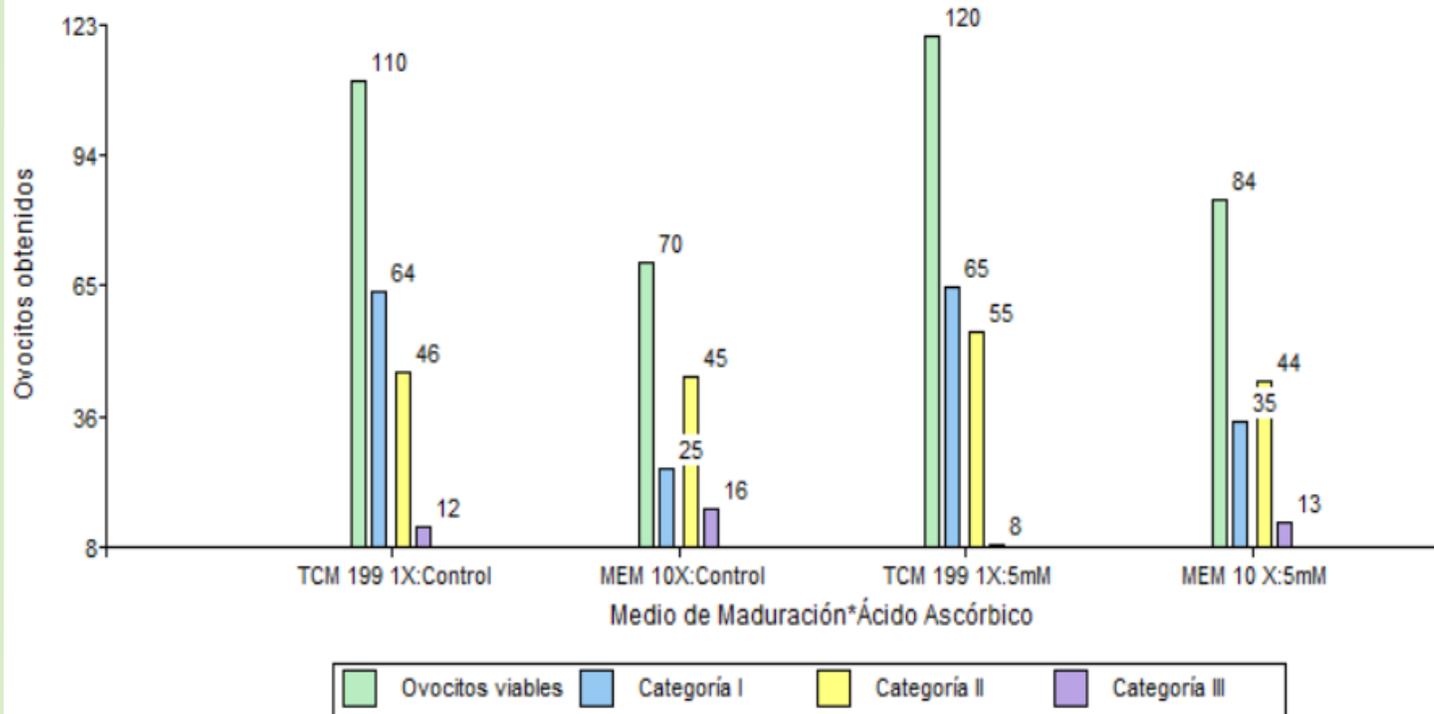
Ovocitos viables

Ovocitos de grado I y II. Son óptimos para realizar las siguientes etapas de la PIV



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

Resultados y discusión



Se utilizaron 252 ovarios de vacas faenadas y se recuperaron 512 ovocitos viables de los cuales, se obtuvo una maduración del 84.57%.

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) y 15-20 (Domínguez Vidal 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).

Resultados y discusión



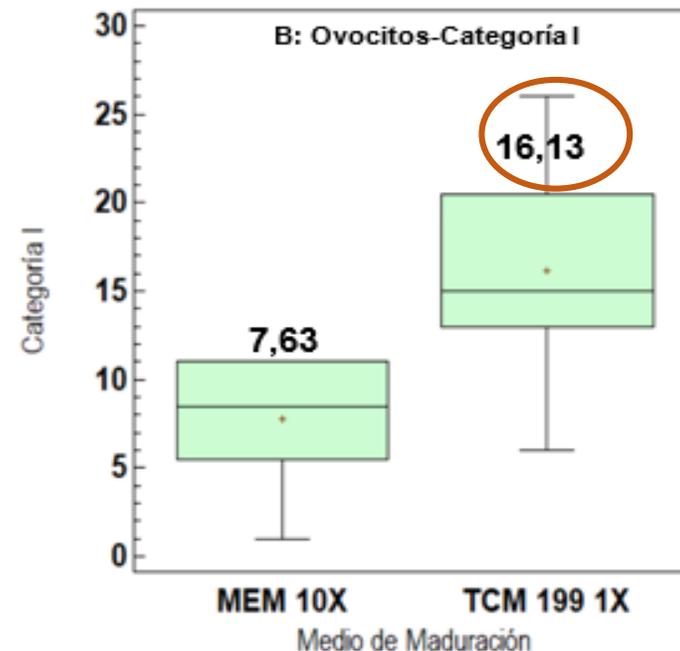
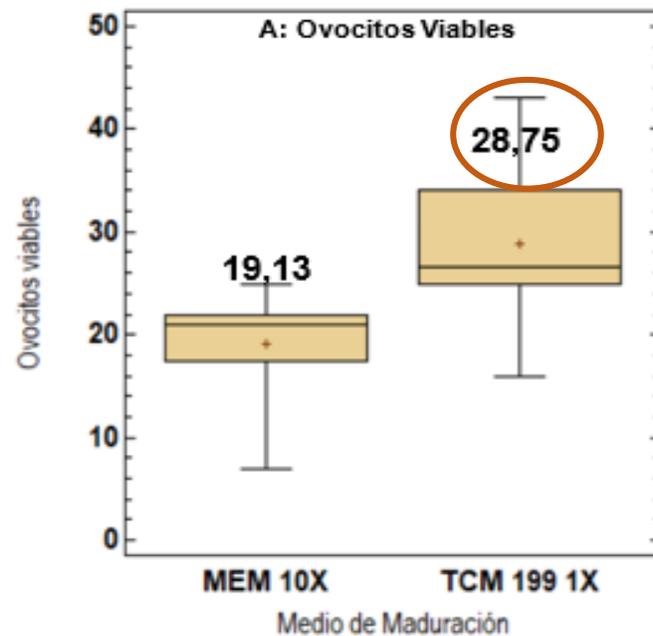
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

CARRERA DE
BIOTECNOLOGÍA

Factor A: Medios de Maduración

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

Medeiros y col. (2009) obtuvieron una mayor tasa de maduración (81,9%) utilizando el medio TCM ya que tiene una mayor riqueza de nutrientes, siendo mejor para la maduración.



El medio TCM 199 da como resultado una mayor división celular, por tanto, permite obtener un mejor desarrollo embrionario a diferencia de otros medios (Gandhi et al., 2000).

Resultados y discusión

Factor B: Concentración de ácido ascórbico



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

CARRERA DE
BIOTECNOLOGÍA

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

La adición de vitamina C al medio de maduración de ovocitos no generó ningún efecto sobre la maduración de los ovocitos bovinos, (Kere et. al.,2013)

La variabilidad de los resultados viene dada por la especie animal, el tiempo de exposición y las concentraciones empleadas (García Díaz et al., 2013).

Miclea y Zahan (2021) mostró que el ácido ascórbico mejora las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.

Interacción AXB

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

El efecto beneficioso de la adición de vitamina C podría atribuirse a una mejora de las condiciones de cultivo y la maduración citoplasmática de los ovocitos (Al-shimaa et. al., 2017)

Conclusiones



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

CARRERA DE
BIOTECNOLOGÍA

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



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

CARRERA DE
BIOTECNOLOGÍA

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.

Se recomienda evaluar la MIV utilizando ácido ascórbico con una mayor amplitud de concentraciones



¡Gracias por su
atención!