



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Producción de embriones in vitro con resveratrol y Tocoferol (Vitamina E) para lograr un
45% de blastocistos viables.**

Borja Cuadro, Carol Lisseth

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Carrera Garces, Fredy Ph.D.

29 de agosto del 2023

Reporte de verificación de contenido



Proyecto IC. Listo Carol Borja.pdf

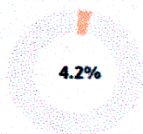
Scan details

Scan time:
August 29th, 2023 at 12:59 UTC

Total Pages:
44

Total Words:
10995

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.4%	46
Minor Changes	0.1%	12
Paraphrased	3.7%	409
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
● AI text
● Human text

Plagiarism Results: (8)

- PDF Descargar libre
<https://docplayer.es/18228557-.html>
Iniciar la sesión ...

1.7%

Firma:



Firmado electrónicamente por:
FREDY PATRICIO
CARRERA GARCES

Fredy Patricio Carrera Garces

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: **“Producción de embriones in vitro con resveratrol y Tocoferol (Vitamina E) para lograr un 45% de blastocistos viables”** fue realizado por la señorita estudiante **Borja Cuadro Carol Liseth**, 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 analizada 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, 29 de agosto del 2023

Firma:



Escaneado al verificarlo por:
**FREDDY PATRICIO
CARRERA GARCÉS**

Freddy Patricio Carrera Garces

C. C.: 0602031569



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

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Borja Cuadro Carol Lisseth**, con cédula/cédulas de ciudadanía N° 171933921-8, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: :
“Producción de embriones in vitro con resveratrol y Tocoferol (Vitamina E) para lograr un 45% de blastocistos viables” 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, 29 de agosto del 2023

Firma

Borja Cuadro Carol Lisseth

C.C.: 1719339218



Departamento de Ciencia de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo Borja Cuadro Carol Lisseth, con cédula de ciudadanía n° 1719339218, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Producción de embriones in vitro con resveratrol y Tocoferol (Vitamina E) para lograr un 45% de blastocistos viables”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo, 29 de agosto del 2023

Firma

Borja Cuadro Carol Lisseth

C.C.:1719339218

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios y a cada ser que estuvo conmigo guiándome, enseñándome, aportando, impulsando, empujando para cumplir la captura de tan soñada meta, les dedico a ustedes con mucho amor y esfuerzo.

Agradecimiento

Gracias a Dios, quien permitió que fuera posible ser la persona que soy en la actualidad y quien abrió siempre las puertas desde un principio para que me forje como el ser humano que soy, y como ahora profesional que me considero; a mis padres que a pesar de todo siempre me impulsaron con sabiduría a que llegue a cumplir mis sueños, fueron ese pilar que cada hijo desearía tener y enseñarme que la llave hacia cualquier puerta son los estudios; mi familia, mi amado esposo John Cruz y atesorado hijo Edward, representan mi motor de día a día, mi fortaleza para no dejar de batallar, mi inspiración para dar lo mejor de mí; a mis tías Fresia y Martita Borja que fueron un gran apoyo con oraciones, cariño y palabras sabias de aliento, haciéndome saber no solo a mí sino al mundo que no estaba sola. A mi querido y estimado tutor, el Dr. Fredy Carrera que primeramente fue un guía excepcional enseñándome las virtudes que un verdadero docente debe tener, sabio y ejemplar en todo aspecto y quien me brindo desde un inicio la oportunidad de ser partícipe en este lindo proyecto. A mi prestigiosa Universidad y a todas las personas que forman parte de ella representando en conjunto esa alma mater de los verdaderos profesionales del futuro. A cada uno de mis compañeros que con mucho cariño compartimos gratificantes momentos, que a pesar de que íbamos como estudiantes recargados de no solo estrés de estudio me sacaban una sonrisa haciéndome olvidar de todo y desconectar por un momento de la realidad del mundo, de verdad Gracias, cada uno de ellos se llevó partecita de mi corazón. Mis queridas amigas Sthefy Alban y Diana Macías quienes fueron las primeras y las ultimas dentro de la faceta como estudiante que no me dejaron rendir brindando su apoyo incondicional. Agradecer a mis compañeros que fueron fundamentales y sin ellos creo que no se podría haber logrado el objetivo Roxana Taco, Deivis Tandazo, también a los pasantes Alejandro Paredes y Yadira Macias. A mi querida amiga que no podía faltar, Jessica Orovio por su apoyo y ayuda este trabajo. Y por último a alguien que me enseñó a no solo ser un empleado más en una institución o en el trabajo, sino que al hacer las cosas con amor esto hace que todo sea posible y que funcione, la Ing. Valeria Campoverde.

Índice General

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice General.....	8
Índice de Tablas.....	11
Índice de Ilustraciones	12
Resumen.....	13
Abstract	14
Capítulo I.....	15
Introducción.....	15
Formulación del problema	15
Justificación.....	16
Objetivos del proyecto.....	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos.....	18
Capitulo II	19
Marco Teórico	19
Aparato reproductor femenino bovino	19
Ovarios	19
Trompas de Falopio	20

Útero	21
Vagina	22
Genitales externos	23
Fisiología de la reproducción bovina	24
Foliculogénesis	24
Maduración del Óvulo	31
Crecimiento del ovocito.....	31
Preparación del ovocito para fecundación.....	32
Ovulación.....	32
Criterios que se evalúan para una selección y maduración de ovocitos dentro de la PIV	35
Fecundación y segmentación	37
Interacción del espermatozoides y el ovulo	37
Fertilización	38
Segmentación	38
Curso normal.....	38
Desarrollo temprano embrionario	38
Capítulo III.....	40
Materiales y Métodos.....	40
Área y ubicación de Estudio	40
Ubicación Ecológica.....	41
Materiales.....	41
Preparación de Soluciones	43
Solución de transporte.....	43
Solución de lavado y aspirado de ovocitos/ Solución Dulbecco 1L	43
Solución Dulbecco Enriquecida	43
Medio de Maduración TCM 1X	43

Medio SP-Talp.....	44
Medio SP-Talp enriquecido.....	44
Medio FERT-Talp.....	44
Medio FERT-Talp enriquecido.....	45
Solución de capacitación de esperma – Gradiente de Percoll al 90%.....	45
Solución de capacitación de esperma – Gradiente de Percoll al 45%.....	45
Solución SOFT 4M o medio de maduración de cigotos.....	45
Solución Stock y disolución en concentraciones de 0.5-10µM Antioxidante Resveratrol ...	46
Solución Stock y disolución en concentraciones de 0.5-10µM Antioxidante α-Tocoferol ...	46
Metodología.....	46
Trasporte y lavado de Ovarios.....	46
Aspirado de ovocitos.....	47
Lavado y selección de ovocitos a madurar.....	47
Fertilización de ovocito y capacitación de esperma.....	48
Denudamiento de ovocitos.....	49
Diseño experimental y análisis estadístico del estudio.....	51
Capítulo IV.....	52
Resultados y Discusión.....	52
Maduración de Ovocitos.....	53
Maduración de Blastocistos.....	59
Capítulo V.....	65
Conclusiones.....	65
Recomendaciones.....	66
Bibliografía.....	67

Índice de Tablas

Tabla 1 Características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas de los folículos en el ovario. .	26
Tabla 2 Materiales, insumos, reactivos y muestras biológicas utilizadas en la investigación. ...	41
Tabla 3 Cantidad de ovocitos recolectados.	52
Tabla 4 Resultados Maduración de Ovocitos con influencia de Tocoferol.....	53
Tabla 5 Resultados obtenidos maduración ovocitos con Resveratrol.....	54
Tabla 6 Análisis de porcentaje de ovocitos obtenidos	55
Tabla 7 Análisis media maduración de ovocitos respecto a influencia de Antioxidantes	56
Tabla 8 Análisis de media respecto al subgrupo concentración de Antioxidantes	57
Tabla 9 Resultados blastocistos con influencia de Tocoferol	60
Tabla 10 Resultados obtenidos con Antioxidantes Resveratrol a distintas concentraciones.	61
Tabla 11 Análisis estadísticos de obtención de blastocistos	62
Tabla 12 Análisis medias concentraciones en blastocistos.....	63

Índice de Ilustraciones

Figura 1 Ciclo estral de la vaca.....	25
Figura 2 Esquema de la dinámica folicular en el periodo del ciclo estral bovino.	28
Figura 3 Estructura y estado del folículo antes de encontrarse en la etapa de ovulación.....	33
Figura 4 Factores que estimulan, TIMP, PAI, NO	34
Figura 5 Clasificación y caracterización de ovocito para selección y medida de calidad	36
Figura 6 Fusión de gametos.....	37
Figura 7 Estructura de mórula y blastocisto.	39
Figura 8 Ubicación geográfica del trabajo de Integración Curricular.	40
Figura 9 Formación de embrión con relación al tiempo de cultivo.	50
Figura 10 Grafica de porcentaje de ovocitos respecto a la aplicación de los antioxidantes.....	56
Figura 11 Ovocitos bovinos viables. Ovocitos madurados con Tocoferol.....	57
Figura 12 Resultados de pre y post maduración con Resveratrol.	58
Figura 13 Estadística de significancia respecto al Factor A y Factor A: B.....	62
Figura 14 Desnudamiento de ovocitos fecundados y resultados blastocistos.	64

Resumen

Los procesos de producción *in vitro* de blastocistos en la reproducción animal a nivel mundial ha sido una de las técnicas biotecnológicas más sobresalientes en cuanto a mejoramiento genético y la precisión selectiva de rasgos cuantitativos y cualitativos de bovinos. Una de las principales causas de daño celular y déficit en la tasa de cultivo embrionario *in vitro* de bovinos es el estrés oxidativo por el cual pasan las células germinales y blastocistos durante el proceso de producción embrionario enfrentándose a factores de cambios drásticos que generan impacto directo en los mecanismos de señalización celular, generando ROS (especies reactivas de oxígeno) y daño celular. La aplicación de antioxidantes demuestra la donación de electrones a oxidantes influyendo en la eliminación de reactividad y manteniendo el equilibrio prooxidante / antioxidante protegiendo la célula del daño oxidativo. Como objetivo de esta investigación fue la producción *in vitro* de embriones con influencia de antioxidantes Resveratrol y α -Tocoferol para alcanzar un 45% de blastocistos viables. Para la maduración de cigotos y cultivo de blastocistos se emplearon tratamientos de α -Tocoferol en concentraciones de 100 μ M y 200 μ M, y Resveratrol a concentraciones 0.5 μ M y 10 μ M para evaluar la adecuada aplicación de los mismo con mayor producción de blastocistos viables. Se aplico un Análisis ANOVA anidado con subgrupo ANOVA de una sola vía lo que reflejo una diferencia significativa de ($P < 0.0241$), para influencia de antioxidante siendo α -Tocoferol un mayor incidencia en la producción de blastocistos con un 34.92% frente a Resveratrol 29.90%, respecto al subgrupo concentraciones se obtuvo significancia como tal del ($P < 0.000000398$), siendo la concentración de 100 μ M de α -Tocoferol con mejor influencia el en el desarrollo de blastocitos a partir del cultivo de cigotos madurados con dicha concentración alcanzando un 47.36% de viabilidad. Demostrando que la adición de antioxidantes en la producción *in vitro* de embriones mejora la capacidad de obtención de blastocistos viables.

Palabras claves: Blastocistos, cigotos, biotecnología, reproducción animal, mejoramiento genético, antioxidantes, Resveratrol, α -Tocoferol.

Abstract

In vitro production processes of blastocysts in animal reproduction worldwide have been one of the most outstanding biotechnological techniques in terms of genetic improvement and the selective precision of quantitative and qualitative traits of bovines. One of the main causes of cell damage and deficit in the in vitro embryo culture rate of bovines is the oxidative stress through which germ cells and blastocysts go through during the embryo production process, facing factors of drastic changes that generate a direct impact on cell signaling mechanisms, generating ROS (reactive oxygen species) and cell damage. The application of antioxidants demonstrates the donation of electrons to oxidants, influencing the elimination of reactivity and maintaining the pro-oxidant/antioxidant balance, protecting the cell from oxidative damage. The objective of this research was the in vitro production of embryos with the influence of antioxidants Resveratrol and α -Tocopherol to reach 45% viable blastocysts. For the maturation of zygotes and culture of blastocysts, α -Tocopherol treatments were used at concentrations of 100 μ M and 200 μ M, and as for Resveratrol, treatments at 0.5 μ M and 10 μ M concentrations were used to evaluate the adequate application of the same with greater production of viable blastocysts. A nested ANOVA Analysis with a one-way ANOVA subgroup was applied, which reflected a significant difference of ($P < 0.0241$), for the influence of antioxidants, with α -Tocopherol having a higher incidence in the production of blastocysts with 34.92% compared to Resveratrol 29.90. %, with respect to the subgroup concentrations, significance was obtained as such ($P < 0.000000398$), with the concentration of 100 μ M of α -Tocopherol having the best influence on the development of blastocysts from the culture of matured zygotes with said concentration reaching 47.36 % viability. Demonstrating that the addition of antioxidants in the in vitro production of embryos improves the ability to obtain viable blastocysts.

Keywords: Blastocysts, zygotes, biotechnology, animal reproduction, genetic improvement, antioxidants, Resveratrol, α -Tocopherol.

Capítulo I

Introducción

Formulación del problema

Una de las herramientas biotecnológica que ha causado mucho impacto en cuanto a mejoramiento genético en bovinos es la producción *in vitro* de embriones ya que disminuye el tiempo generacional entre animales, además que acelera la producción de animales de alto valor genético, previo a una aspiración folicular *in vivo*, la eliminación prematura de hembras genéticamente favorables que tengan alguna alteración adquirida (enfermedad o patología que no se transmite a su descendencia) y que además reprime la facilidad de una reproducción natural (Gonella et al., 2013)(Looney et al., 1994). Las investigaciones más frecuentes que se suele hacer mediante la reproducción *in vitro* de embriones es para profundizar conocimientos sobre los mecanismos bioquímicos, procesos genéticos y todos los procesos involucrados dentro de producción como tal según (Leidenfrost et al., 2011). Alrededor del mundo se produce un aproximado de unos 1.5 millones embriones con un aumento del 7.0% a comparación del año 2019 y estos datos recopilados del año 2020 según la Sociedad Internacional de Tecnología Embrionaria (IETS) (International Embryo Technology Society's & Joao, 2021) siendo Brasil el país pionero en cuanto a PIV a nivel mundial (Block et al., 2011).

El proceso de producción *in vitro* de embriones conlleva cuatro etapas: la recolección de ovocitos, luego estos ovocitos pasan a un proceso de maduración *in vitro* (MIV), para luego ser fertilizados *in vitro* (FIV), y por último proceso el cultivo de embriones *in vitro* (CIV) que conlleva un lapso de 6 a 7 días de cultivo(García Jorge et al., 2017). La situación actual del Ecuador requiere de dichas aplicaciones para un mejoramiento en la productividad pecuaria, el objetivo principal es la preñez rápida y eficiente en las vacas después de un parto, sin

embargo, dicho ciclo disminuye, y consecuente a ello la rentabilidad del sector agrícola ganadero, es por ello por lo que la PIV se constituye en una gran alternativa de solución para este problema de producción ganadera (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019).

La PIV es un proceso de manejo delicado donde los gametos están constantemente en manipulación, durante las etapas de (MIV), (FIV) y (CIV), este ambiente *in vitro* provoca estrés oxidativo en los embriones con una mayor concentración de oxígeno entre (20%) en contra de un ambiente *in vivo* de 3 al 5%, la frecuente exposición a la luz, los componentes del medio de cultivo, variaciones en el pH, procesos de centrifugación y manipulación directa, conlleva a una alteración en la funcionalidad de biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos (Guzmán et al., 2016) (Rodríguez et al., 2018).

Los embriones, al estar frente a un estrés oxidativo, generado por la presencia de radicales libres en exceso y la disminución del glutatión (GSH) estos factores impiden que los embriones lleguen a un estadio de blastocisto, promoviendo, y el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Un radical libre se lo define como una molécula con un número impar de electrones de valencia o a su vez que no está pareado. Al presentarse de manera sobresaliente tienden a ser dañinos provocando fisiopatologías (Covarrubias et al., 2008). En cuanto a las ROS se originan por la reducción de oxígeno al poseer un radical libre dentro de la cadena de electrones mitocondriales cuando ocurre la respiración celular (ZHONG & ZHOU, 2013).

Justificación

Los sistemas de defensas otorgados por antioxidantes enzimáticos, llámense catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y reductasa; así como también los antioxidantes no enzimáticos entre ellos la vitamina C, tocoferol o vitamina E, vitamina A,

piruvato, resveratrol, glutatión, son los que confrontan y bloquean a los radicales libres y sus derivados, en este caso los ROS (Sikka, 2004).. Cuando existe el desequilibrio entre antioxidantes y ROS las condiciones fisiológicas son adversas para el caso de PIV, ya que su desequilibrio conlleva desnaturalizar moléculas de lípidos, carbohidratos, aminoácidos, ácidos nucleicos proporcionando una disminución en la viabilidad, daños en cuanto a expresión genética, síntesis de proteínas, y todo proceso molecular de importancia para gametos y embriones (Gupta et al., 2010) (Zullo et al., 2016).

Dentro de la PIV se sabe que la adición de resveratrol como suplemento en medios de cultivo origina una mejora en la estructura del ovocito aumentando la GSH sin ver efectos intracelulares de ROS (Wang et al., 2018) (Piras et al., 2020). Otros compuestos que generan una mejora en los ovocitos utilizados para PIV son los antioxidantes entre ellos el α -tocoferol que al estar presente dentro de la dieta del animal o al ser consumido por el mismo hay una remoción directa de ROS y brindan protección antes las reacciones destructivas de las ROS. El α -tocoferol como antioxidante se encuentra de manera natural como vitamina E que predomina en células animales y al entrar en contacto con la membrana celular se adhiere creando una oxidación al entrar en contacto con los radicales libres proveyendo protección celular ante un proceso de manipulación como la PIV. El presente estudio tiene la finalidad utilizar el resveratrol y tocoferol como antioxidantes para alcanzar un porcentaje mayor al 45% de blastocistos.

Objetivos del proyecto

Objetivo General

Determinar la influencia del resveratrol y tocoferol (vitamina E) en la producción de embriones *in vitro* para lograr el 45% de blastocitos viables.

Objetivos Específicos

- Evaluar los cigotos *in vitro* a partir del cultivo con resveratrol, tocoferol (vitamina E), e incubados con 5% de CO₂.
- Remover las células del *Cumulus oophorus* de los cigotos y pasar a solución de maduración con resveratrol y tocoferol (vitamina E) para incubar en cámara de CO₂ al 5%.
- Distribuir los cigotos seleccionados en solución de maduración con resveratrol, tocoferol (vitamina E) para incubar en cámara de CO₂ al 5%.

Capítulo II

Marco Teórico

Aparato reproductor femenino bovino

El aparato reproductor de una hembra es de gran importancia porque al interior ocurre trascendentales procesos para el desarrollo embrionario y una vez que finaliza la etapa de crecimiento embrionario se da lugar al parto, dando la bienvenida a un nuevo ser (Toribio, 2013).

Por ello es importante conocer cada uno de los órganos que implica la creación de este ser. El aparato reproductor bovino está formado por los siguientes órganos: internos, externos y anexos

- **Órganos externos:** Vulva, triángulo ventral de la vulva, clítoris, glándula de Bartolini, orificio urinario, cuerpo de la vagina, flor radiada
- **Órganos internos:** Cérvix o también llamado cuello uterina, anillos cervicales, cuerpo del útero, bifurcación, cuerno uterino derecho e izquierdo, carúnculas endometriales, están también los oviductos derecho e izquierdo como los ovarios derecho e izquierdo.
- **Órganos anexos:** Vejiga que se liga al aparato reproductor y esta entrelazada directamente con la apertura uretral en el cimienta de la vagina. Por otro lado están los ligamentos anchos uterinos y por último el recto que se encuentra en la parte superior del aparato reproductor.

Ovarios

Cada hembra bovina tiene normalmente dos ovarios lo cuales son generadores de ovocitos y hormonas sexuales, también llamados como órganos gameto hormonales.

Principalmente su mejor estado tanto morfológico como fisiológico depende de la edad del animal, su estilo de vida o salud física, y los partos que haya tenido, y todo esto cambia también dependiendo de la colocación del útero.

Su morfología es oval, relacionándose tamaño y forma respecto a la edad y dependiendo del ciclo estral, su tamaño también varía si es una ternera que tienden a ser mucho más pequeños que en una vaca adulta (3-4 cm longitud, 2.5 cm ancho, 1.5-2 cm espesor) su peso varía entre los 6.15-20g y por lo general el ovario suele ser más grande que el izquierdo ya que existe una actividad fisiológica más fuerte o intensa (Hafez & Hafez, 2002).

Este órgano lo constituye una médula, corteza, rodeada por un epitelio superficial también conocido como epitelio germinal en donde presenta una serie de folículos vistos como vesículas, estos folículos ováricos están lleno de un líquido amarillo transparente y pueden medir hasta 2cm, están los crepúsculos sólidos que tienden a ser amarillos y pueden sobresalir como botón con un diámetro de 1-2 cm llamados cuerpos amarillos o lo que resta de ellos; la médula se compone por tejido conectivo fibroelástico irregular con sistemas vasculares y nerviosos que llegan al ovario por medio del hilio. Las arterias llegan a el de manera espiral definidas y su flujo de sangre arterial tiene cambios de manera proporcional dependiendo del cuerpo lúteo o amarillo, la progesterona aumenta o disminuye con respecto a este mismo flujo sanguíneo arterial y como se dijo anteriormente esto varía dependiendo del ciclo estral (Toribio, 2013).

Trompas de Falopio

También conocidas como oviducto o trompas uterinas, son flexibles se sitúan en los ligamentos suspensorios del oviducto mososalpinx y que continua hacia el ligamento amplio del útero, que al ser acompañado con el mesovario y el mesosalpinx componen la bolsa ovárica.

Dichas trompas uterinas son conectoras directas entre el útero y los ovarios. Su estructura se comprende como un tubo delgado de 20-35cm de largo y 2-4mm de ancho ondulante; puede ser divididas en cuatro segmentaciones: fimbrias que están en forma de olán, el infundíbulo la cual es la abertura abdominal que tiene forma de un embudo aproximada al ovario, una ampolla que suele tener un estado de dilatación y se encuentra de manera más distal es bastante blanda y tiene un diámetro de 4-5mm considerada la de más importancia ya que aquí ocurre el anfimix conocido también como fecundación, y por último el istmo que viene a ser un parte proximal angosta del oviducto que se conecta a la luz uterina (Castañeda Martinez & Martinez, 2009).

Útero

También llamado como matriz, este órgano se constituye con dos cuernos que son, un cuerno y cuello o cérvix. El útero se encuentra bipartido, su epitelio presenta varias carúnculas y cada lado uterino se unen a la pared pélvica y abdominal por un ligamento ancho. Una de sus principales funciones conjunto con los líquidos endometriales dentro del proceso reproductivo es el transporte de espermatozoides desde que se da la eyaculación de ellos hasta el momento en que ocurre la fecundación, además regula las funciones que desempeña el cuerpo amarillo y es la incubadora natural del embrión desde su estado de implantación hasta el parto.

Sus cuernos uterinos se bifurcan por ligamentos transversales con diámetros distintos dependiendo de la edad y número de partos, en vacas adultas suelen tener un diámetro de 2-3 dedos anular con característica asimétrica, su longitud está entre los 35-45cm.

El cuerpo uterino es definido como una cavidad la que tiene entre 2-5 cm de largo representa una pequeña parte de la cavidad uterina incluido en la formación del feto ya que este se da en el cuerno uterino

El cérvix en cambio viene a ser la parte más importante del aparato genital tiene similitud con un esfínter que sirve para separar anatomía y fisiología del útero con respecto a la vagina. Estructuralmente tiene paredes gruesas y rígidas, es cilíndrico y se sitúa en el suelo de la cavidad pélvica, en vacas adultas esta con un largo de 10-15cm y un grosor de 3-5cm.

Vagina

Órgano musculoso y membranoso llamado también cúpula situado de manera horizontal en la cavidad de la pelvis entre la vejiga y el recto detrás del cuello uterino. Las paredes de la vagina crean el cierre de la cavidad vaginal y ésta solo se abre en el momento de la penetración del aire, en un examen vaginal y en penetración por el miembro reproductor masculino.

Consta de un epitelio superficial, es serosa y posee una capa muscular. En razas de carne o vacas longevas está de manera alargada, sus medidas oscilan entre los 15-30cm en etapa gestante, su unión a la pelvis es gracias a un tejido conectivo rico en grasa y el peritoneo. El único animal que presenta un esfínter posterior muscular anterior, luego del esfínter posterior el cual sí está presente en todos los animales mamíferos domésticos (Hernandez et al., 2008).

Su fisiología se caracteriza por las secreciones vaginales como respuesta psicosexual, tiene también respuesta inmunológica ya que al poseer unas células plasmáticas que se localizan en el epitelio tienden a activar inmunoglobulinas A y G capaces de prevenir infecciones bacterianas y producir anticuerpos contra espermatozoides (B. Hafez & Hafez, 2002).

El líquido vaginal, junto con otras secreciones, en cambio cumple la función de presentar peculiares olores perceptibles ante otros animales donde se puede identificar si un animal está en el estro o diestro. La flora microbiana vaginal presenta microorganismos

aerobios como anaerobios facultativos y obligados, estas distintas cepas pueden ir cambiando a lo largo de vida del animal.

Otra de las funciones de la vagina, al ser un órgano copulativo se encarga por medio de macromoléculas del moco cervical de transportar a los espermatozoides hacia que se pueda dar la fecundación, pero también participa la interacción del moco cervical, secreción vaginal y plasma seminal para proteger los espermios y generar un pH acogedor para su sobrevivencia en el interior de la vagina.

También cumple la función de ser conducto excretor para secreciones del endometrio, oviducto y el principal cuello uterino, siendo es el principal canal de parto. Todo esto es posible a varias características como de contracción, involución secreción, expansión y absorción.

Genitales externos

Aquí se encuentra los labios mayores, menores, vestíbulo, clítoris y glándulas vestibulares

- *Vestíbulo.* – Es la marcación entre el himen y el orificio uretral, se extiende hacia el interior aproximadamente 10cm y llega a dicho orificio por medio de la abertura de la superficie ventral.
- *Labios mayores y labios menores.* – Los labios mayores poseen mayoritariamente de glándulas sebáceas y tubulares, su tejido es elástico y tiene una ligera capa de músculo liso, su apariencia externa es la misma que la piel exterior del animal; mientras que, lo labios menores, poseen un tejido conectivo esponjoso.
- *Clítoris.* – Esta escondido por la comisura del vestíbulo, su origen es el mismo que el de un toro si se habla embriológicamente, el tejido de esta parte es eréctil y su cubierta es por un epitelio escamoso estratificado, al ser un clítoris como mucho otros no se

escapan de tener numerosas terminaciones nerviosas las cuales poseen una prominente sensoria ante el estímulo.

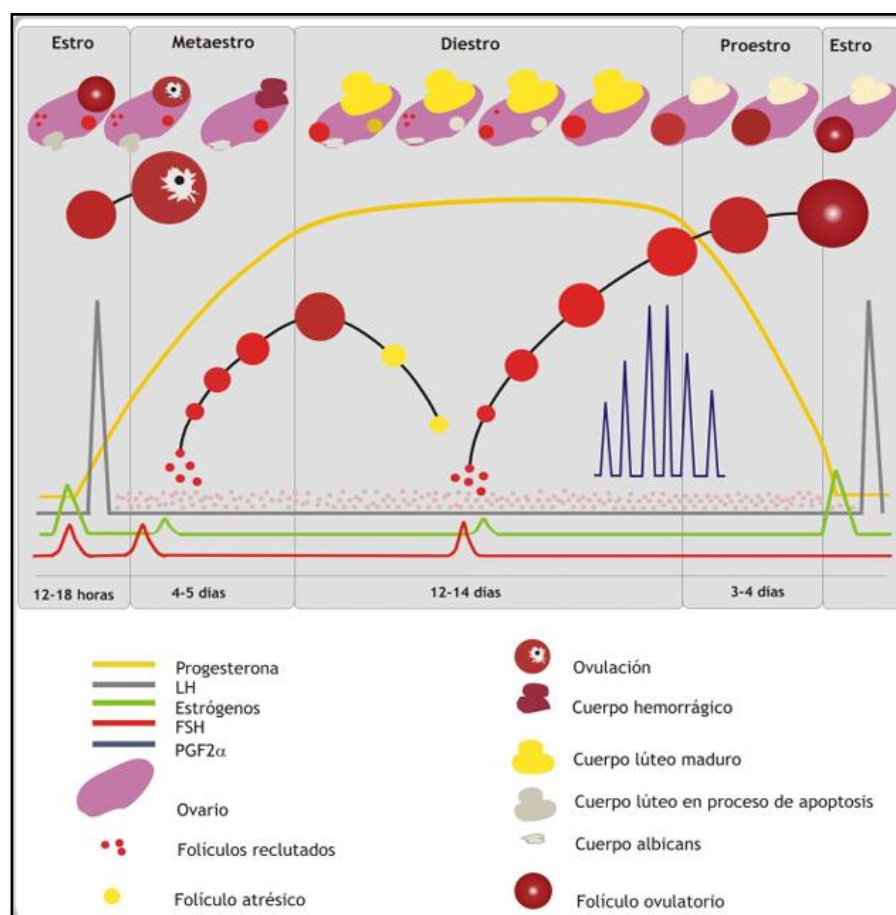
Fisiología de la reproducción bovina

Foliculogénesis

Es un proceso que controla e implica proliferación y la diferenciación de células de granulosa, el cual está coordinado por factores como la FSH, LH, gonadotropinas que son indispensables para el desarrollo de folículos, considerados como unidad fundamental del ovario ya que contiene los ovocitos lo cuales al pasar procesos dinámicos puede desarrollarse una posible fecundación y posteriormente desarrollarse un embrión. Los folículos se forman desde que un feto está en pleno desarrollo, pero a estos se lo denomina folículos primordiales, dichos folículos empiezan a tomar crecimiento meses después del nacimiento de animal bovino, muchos de ellos o muy bien cumplen su ciclo de madurar y ovular como también pueden perderse y ser reabsorbidos.

Figura 1

Ciclo estral de la vaca



Nota. Ciclo estral de la vaca, entre dos estros presentados a los 21 días con sus respectivos cambios ováricos y hormonales en distintas etapas. Fuente: Manual de inseminación artificial en bovinos (2009).

La secreción de estrógenos que hay durante el periodo de estro se debe al folículo de mayor tamaño y esta secreción decrece de manera veloz al momento en que entra la presencia inmediata de la hormona luteinizante (Castañeda Martínez & Martínez, 2009).

Tabla 1

Morfología característica del ovario con sus respectivas características fisiológicas.

Componentes	Características morfológicas/ fisiológicas
Células de la teca	- Segrega andrógenos al subir niveles de LH. Con la presencia de la ovulación se transforman a células luteicas de la teca.
Pared folicular	- Se forma por células de granulosa y de la teca las cuales las divide una lámina, sus principales cambios ocurren cuando la glándula endocrina y exocrina libera la organogénesis.
Células de la granulosa	- Vienen a ser células de soporte que participan en el desarrollo del gameto femenino, se origina a partir de las células celómicas.
Corona radiada	- También llamado ovigero donde se encuentra el ovocito previo a la ovulación.
Folículo primordial	- Son folículos con ovocitos centrales que tienen una capa de células de cúmulus. Se encuentra en fase profase meiótica estacionaria hasta que retomen la maduración (B. Hafez & Hafez, 2002).
Folículo secundario	- Participa en la producción de células granulosas, como en el crecimiento folicular, además da formación a la zona pelúcida, y una diferenciación de la teca
Folículo vesicular	- Incrementa las células de la granulosa por mitosis y luego estas mismas células se convierten en cuboides
Líquido folicular del antro	- Es el folículo maduro, pronto a romperse, encierra licor folicular y además tiene una capa fibrosa, su ovulo ya se ve envuelto por células foliculares, es conocido como folículo de Graff.
Líquido folicular entre células de granulosa	- Posee inhibina que bloquea la maduración del ovocito y e impide que exista relación con la LH Rico en esteroides sexuales, proteínas plasmáticas entre otros.
	- Líquido viscoso, rico en ácido hialurónico. Concentraciones altas en temporada de ovulación (B. Hafez & Hafez, 2002). Folículos envejecidos presentan este líquido.

Nota. Fuente (B. Hafez & Hafez, 2002).

Crecimiento folicular. En el momento que nace una vaca, sus ovocitos están en fase G2 de profase de primera división meiótica es por eso que se da el reinicio y finalización de la meiosis hasta la futura maduración en la que sea posible la fecundación (Castañeda Martínez &

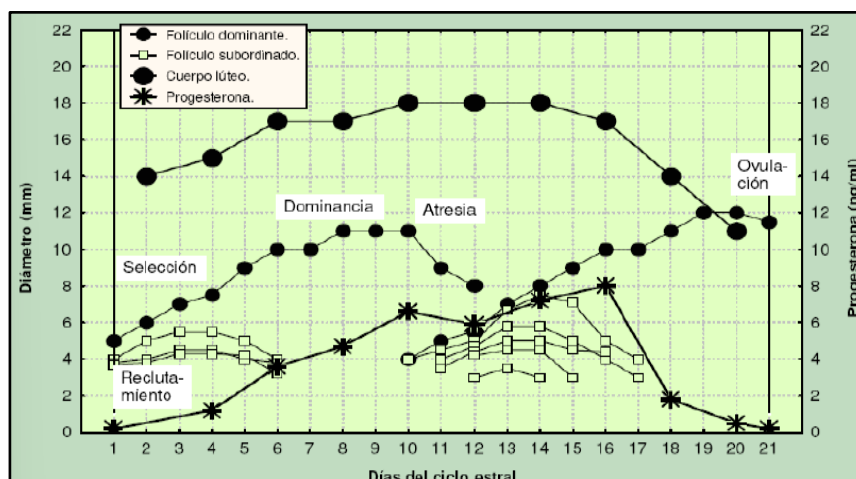
Martinez, 2009). Esto se da a medida que por medio del crecimiento folicular en donde intervienen cambios nucleares y cambios citoplasmáticos (Castañeda Martinez & Martinez, 2009).

La maduración folicular está intervenida por sucesos subcelulares y moleculares como antes se mencionó, hay ciertas hipótesis e interrogantes donde se surge la combinación de que señales endocrinas junto con las metabólicas expresan el desarrollo y crecimiento folicular que influyen de manera directa e indirecta en el desarrollo del ovocito, es por ello que se analiza que, hormona versus factor de crecimiento en el líquido folicular como también de las actividades correlacionada con granulosa-ovocito. Un ejemplo claro es la ingesta de energía dentro de la regulación del desarrollo del folículo puede influir directamente al desarrollo morfológico del ovocito. Entre el consumo energético que tiene el animal, los ácidos grasos tienden a jugar un papel importante ya que forman parte de la estructura de la membrana celular, por ello influyen en el proceso reproductivo ya sea por balance energético como por todas las acciones e interacciones que conlleva la reproducción.

A nivel nuclear se dan los primeros cambios, tales como la ruptura de la vesícula germinal, el bloqueo de la metafase de la segunda división meiótica MII, la progresión a metafase MI, la condensación cromosómica y la extracción del primer corpúsculo polar. La LH ocasiona el reinicio de la meiosis. Cuando el citoplasma madura, sus organelos se reorganizan, dando lugar a la síntesis de proteínas que a su vez aumenta la actividad de quinasas, permitiendo la fosforilación y desfosforilación de proteínas claves que activan a las moléculas reguladoras de la actividad nuclear y a las moléculas ovo plasmáticas.

Figura 2

Esquema de la dinámica folicular del periodo perteneciente al ciclo estral bovino.



Nota. Fuente: (Hernandez et al., 2008)

Reclutamiento folicular. Esto ocurre en proceso de ondas del ciclo estral, primordialmente por tres de estas ondas, y por influencia de receptores de ARNm (RNA mensajeros) para receptores de FSH. La selección de folículos es el procedimiento mediante el cual un conjunto de pequeñas estructuras ováricas, derivadas de los folículos que han estado en desarrollo lento durante los últimos cuatro a seis meses, comienza a crecer rápidamente debido a la influencia de la oleada de la hormona FSH. Cuando la concentración de FSH llega a su punto máximo, los folículos más destacados de esta fase alcanzan un tamaño aproximado de cuatro mm en diámetro. Después de transcurrir tres días, cuando los folículos de mayor tamaño tienen un diámetro cercano a los ocho mm, se elige un único folículo para seguir desarrollándose, el cual se convierte en dominante, mientras que los restantes retroceden (Fig.) (Castañeda Martínez & Martínez, 2009).

Factores de Estimulación o Inhibidores. La Influencia de gonadotrofinas, hay diversos elementos internos en el ovario que controlan el progreso y desempeño de los folículos. Estos elementos abarcan el factor de crecimiento insulínico (IGF) y distintos miembros de la familia del TGF-beta, que influyen en el desarrollo y funcionamiento del folículo. Están las inhibinas, al presentarse en aumento debido a la sinterización de estrógenos foliculares en el ciclo de crecimiento de folículo dominante, disminuyendo niveles de FSH y poniendo en alto el desarrollo de folículos subrogantes, aumentando niveles de andrógenos en las células teca de folículo dominante. La Activinas (ACTs) en cambio se presenta en la etapa temprana del crecimiento folicular, junto con el receptor FSH inducen producción de folistatina (FSP) la cual regula la acción de la activina e inhibina, y en conjunto con la producción de estradiol, receptores de gonadotropinas conllevan a la diferenciación de células de granulosa y promoviendo la luteinización y la atresia. En cuanto a los Factores de crecimiento insulinoide (IGFs) media el efecto de la FSH sobre las células de granulosa, en temporadas de la dominancia folicular sus niveles disminuyen mientras que en la atresia incrementan, interviniendo en los mecanismos de regularización de la foliculogénesis.

Líquido folicular. Producido de un plasma periférico, trasudado por medio de una lámina basal de folículos y se recoge en el antro, en cuanto a su composición bioquímica presencia de esteroides y glucoproteínas elaboradas en células que componen la pared celular del folículo. Contiene 17β estradiol en fase folicular y progesterona para la siguiente ovulación, además de sustancias no esteroideas como inhibidor de maduración polipéptido de peso molecular 1500 Dalton, un inhibidor de la luteinización como proteína compleja, una proteína inhibidora de 1400 Dalton, relaxina de 9000 Dalton, inhibina supresora de mecanismo de FSH. El líquido folicular es supremamente importante para la fisiología del oocito así como para su aspecto bioquímico y metabólico de maduración nuclear y citoplasmática, cabe recalcar las siguientes funciones:

- Regular las funciones de las células de granulosa, y dar inicio folicular y esteroidogénesis.
- Originar y ser parte del proceso maduración del ovocito
- Facilitar la transportación del ovocito hacia el oviducto.
- Preparar el folículo para dar forma al cuerpo amarillo.
- Permitir la capacitación espermática y desarrollo embrionario (B. Hafez & Hafez, 2002).

Endocrinología del crecimiento folicular y ovulación. Se sabe que el hipotálamo cumple las funciones endocrinológicas del organismo, las células de éste al llegar a la neurohipófisis y posteriormente a la adenohipófisis factor de las gonadotropinas liberadoras de FSH y LH, cada una con receptores. Previo a la liberación del óvulo, los andrógenos que se generan en la capa interna de células teca, debido a la influencia de la hormona luteinizante (LH), se desplazan hacia las células foliculares. En estas células, experimentan una transformación en estrógenos, que son responsables de inducir el estro o la receptividad sexual. Durante la ovulación, las células tanto de la capa interna de células teca como las foliculares, bajo la influencia de la LH, comienzan a producir progesterona, lo que da origen al cuerpo lúteo en el lugar que ocupaba el folículo liberado (Hernandez et al., 2008).

Un correcto proceso de maduración, de ovulación y de luteinización del folículo de Graaf depende de las proporciones adecuadas de FSH importante en formar el antro, de LH, y de hormonas como los esteroides, las prostaglandinas y las glucoproteínas.

- Hormona de liberación de gonatrofina (GnRH)
- Hormona Gonadotróficas: Hormona folículo estimulante FSH y LH:
 - **FH:** conocida con otros nombres como factor I, prolan A o thylakentrin, químicamente tiene un peso molecular aproximado de 30.000 en vacas,

comprendida como glicoproteína, soluble en agua y estable en pH de 4 a 11. En cuanto a su función fisiológica dentro de los bovinos es ser estimulante del crecimiento y maduración de folículos precavitarios del ovario.

Independientemente no desempeña la función de madurar, sino que necesita la compañía de la hormona luteinizante, con una buena sinergia después de tener un nivel óptimo en la sangre influyen en las funciones positivas y negativas o retroactivas.

- **LH:** Hormona luteinizante o intersticial cellis stimulating hormone (ICSH) en hembras, en cuanto al macho bovino se la conoce como factor II, proban B o metakentrin; químicamente con un peso molecular aproximado a 25000-30000, constituida como glucoproteína; inmunobiologicamente también se diferencia de otras especies y no solo por el peso molecular. Dentro de su papel funcional se une a la actividad de la FSH, llegando a realizar la maduración final folicular, secretar niveles altos de foliculina, ovulación y conformación del cuerpo lúteo.
 - Sistema del factor de crecimiento tipo insulínico (IGP)
 - Familia de factores de transformadores de crecimiento (TGF)

Maduración del Óvulo

Está compuesta por dos etapas, el periodo de crecimiento y el periodo final que conlleva a la preparación nuclear y citoplasmática previo a la fecundación

Crecimiento del ovocito

El folículo primordial comienza su desarrollo con el ovocito al liberarse de la reserva, el ovocito en este punto casi ha terminado su desarrollo, pasando por la fase del antro, a la vez hay un crecimiento de las células del cumulus, ya que el desarrollo de estas se da al rededor del

ovocito tienen una relación directa con la membrana celular desencadenando prolongaciones celulares del montículo ovárico. (B. Hafez & Hafez, 2002).

Todo este proceso se independiza de:

- Naturaleza de estimulación folicular
- Diámetro que el folículo ha originado
- Origen del líquido folicular

Preparación del ovocito para fecundación

Después de finalizada la ovogénesis, el núcleo diploténico se encuentra en proceso de reposo, definido como núcleo reticular. Cuando hay un aumento de gonadotropinas no puede haber un reinicio de meiosis. Reiniciar la meiosis es solo un aspecto de la maduración del óvulo; También debe ocurrir la maduración citoplasmática (B. Hafez & Hafez, 2002).

Ovulación

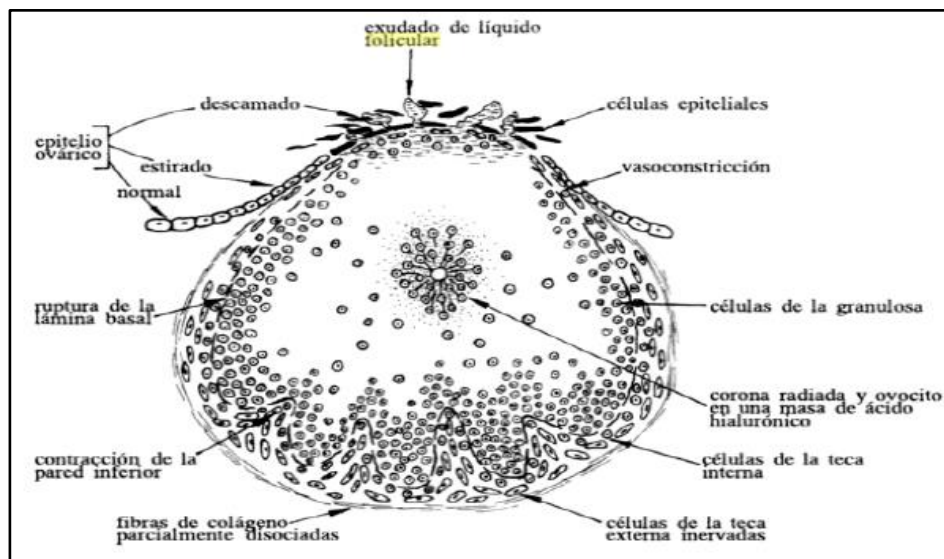
Este proceso sucede después de las 25 a 36 horas transcurridas después del estro. Es decir, se da cuando hay ruptura de la pared folicular y separación de las estructuras de la superficie ovárica, compuestas por el tejido conectivo (Hafez & Hafez, 2002).

Hay tres cambios que los folículos preovulatorios tienden a experimentar:

- La maduración nuclear y citoplasmática del oocito
- La pérdida de adherencia de células del montículo ovárico y las células de la granulosa.
- Afinación y quiebre de pared folicular

Figura 3

Folículo en una pre-ovulación.



Nota. Fuente por autoría propia (2023).

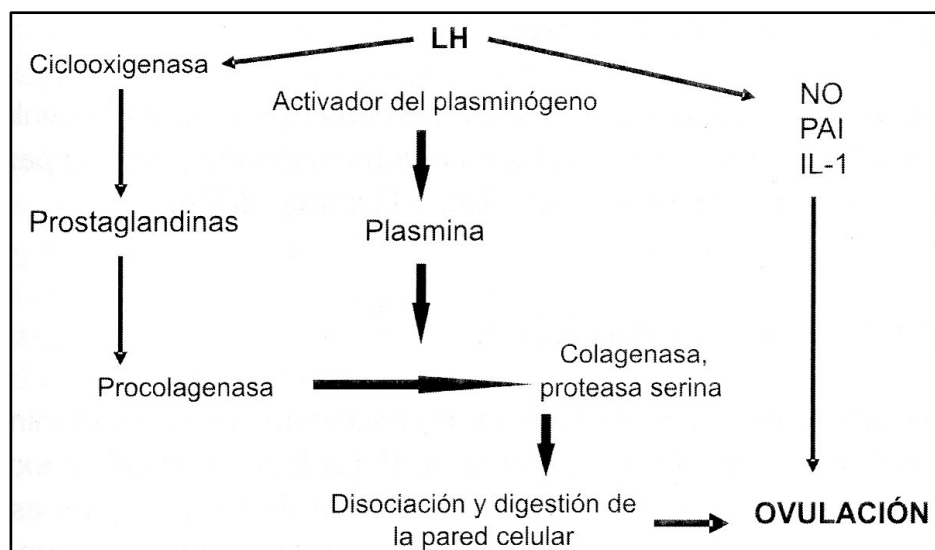
Una vez que finaliza el crecimiento, la capacidad que tiene el folículo de Graaf al responder frente a una descarga de gonadotropinas (LH y en menor proporción de FSH), se produce una reconstrucción total del mismo y libera un ovocito fértil por medio de un vestigio muy pequeño en su pared celular y atraviesa las capas de la corteza ovárica (Castañeda Martínez & Martínez, 2009; Hafez & Hafez, 2002).

Antes que ocurra la ovulación hay un incremento de flujo sanguíneo el cual irriga parte del folículo dominante y disminuye su irrigación en la parte apical del mismo. Esta misma fluidez sanguínea está correlacionada al factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF) y que ayuda a su respectiva permeabilidad.

En las actividades vasculares y del musculo liso hay factores influyentes entre los que se destacan las prostaglandinas, leucotrienos y los tromboxanos, mismas ayudan a la estimulación de LH, tomando a consideración el desempeño de la $PGF2\alpha$ es primordial dentro de la ovulación ya que sus inhibidores de cicloxigenasa irrumpen la ovulación, se ha demostrado que la aplicación de antiprotaglandinas en bovinos afecta directamente la ovulación, pero no la anula (Fig. 4) (Castañeda Martinez & Martinez, 2009).

Figura 4

Esquema de Factores estimulantes en la ovulación).



Nota. Fuente: (B. Hafez & Hafez, 2002)

Existen diferentes mecanismos de ovulación entre ellos están: mecanismo neurobioquímicos y farmacológicos; procesos neuroendocronologos/endocrinos, GnRH, esteroides y prostaglandinas; mecanismos neuromusculares y neurovasculares como también las interacciones enzimáticas. Las prostaglandinas tienen la capacidad de impulsar las contracciones en los ovarios y provocar la activación de los fibroblastos en la capa teca, lo que

conduce a su destrucción y a la liberación de enzimas proteolíticas que degradan la estructura del folículo y su lámina basal, tomando en cuenta que esteroides como la progesterona influye de manera importante en este proceso.

Criterios que se evalúan para una selección y maduración de ovocitos dentro de la PIV

Como se sabe existen técnicas in vivo donde se extraen ovocitos del animal vivo de alto valor genético y dar un aprovechamiento en casos de accidentes imprevistos donde la vida de la vaca se encuentre en riesgo y esto se da por medio de punción ultrasónica, y la segunda es por medio de aspiración en ovarios de matadero, esta última es con fines investigativos.

Dentro de la última técnica mencionada los parámetros de transporte tienen que estar en las mejores condiciones posibles para que no afecte a la viabilidad de los ovocitos.

Para ir abriendo paso a los criterios de selección se toma en cuenta mucho la morfología del citoplasma y de las células del cúmulus para concretar si el ovocito es o no viable para el desarrollo del futuro ser, por ello la calidad del complejo cúmulus ovocito (CCOs), el núcleo y el citoplasma son los más importantes a la hora de determinar si el ovocito es factible para la maduración ya que de esto dependerá mucho sus reservas para dar el futuro embrión.

En una maduración in vitro de ovocito se examinan las siguientes características detalladas a continuación en la presente figura 5:

Figura 5

Clasificación y caracterización de ovocito para selección y medida de calidad en futura fertilización in vitro.



Nota. Fuente Manual de Procedimientos para la Producción y Vitrificación de Embriones Bovinos en Laboratorios de Reproducción Animal (2017).

Fecundación y segmentación

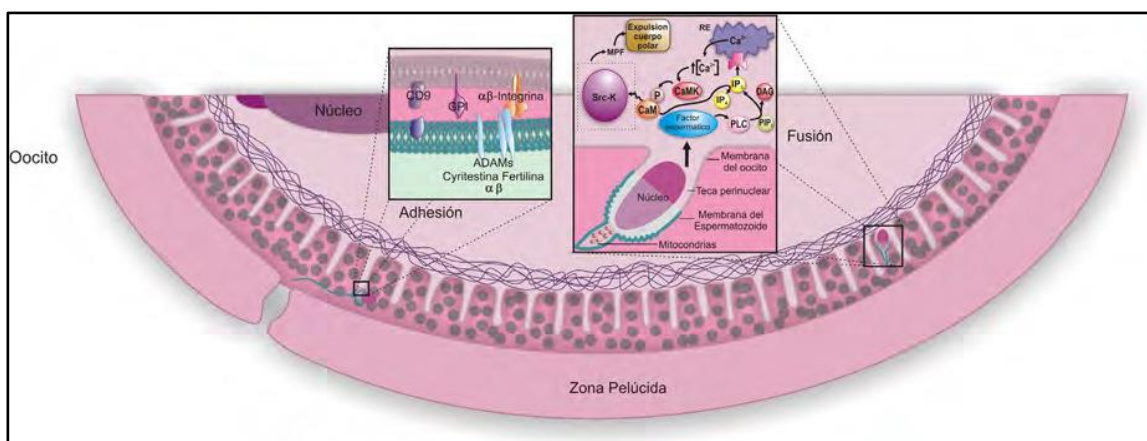
La fecundación es la afirmación de gestación en la hembra bovina, da inicio a un nuevo ser, acarrea desde la etapa de fecundación hasta el parto, por medio de la sincronización de células de gametos maduros (ovocito/espermatozoide).

Interacción del espermia y el ovulo

Pequeña cantidad de células germinales masculinas llegan a atravesar el cumulus ophorus, la interacción de una proteína del espermia conocida como PH-20 sumado a la actividad de la hialuronidasa y a la capacitación concretarán una buena motilidad, y cuando este llega a la zona peri vitelina ocurrirá la adherencia y fusión entre la membrana citoplasmática del ovocito y la membrana de zona ecuatorial del espermatozoide, consecuentemente el ingreso del núcleo espermático y sus organelos al axoplasma ovocitario.

Figura 6

Fusión de gametos.



Nota. Fuente El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. Fuente: Rev Col Cienc Pec Vol 19:4, 2008.

Fertilización

La dieta alta de ácidos grasos especialmente de ácidos linoleicos influye de manera notable la tasa de fecundación y desarrollo del embrión. Una vez realizada la ovulación, el estadio siguiente del ovocito es tener el primer cuerpo polar aquí rodeado por la corona radiada y el líquido folicular, consiguiente cae en oviducto para que se dé la posterior concepción, luego el desnudamiento del ovocito se efectuara por la interacción de la hialuronidasa que se encuentra en el acrosoma del espermatozoide, descomponiendo el ácido hialurónico, compuesto presente en las células del cumulus.

Segmentación

Una vez que se forma el cigoto, pasa por divisiones mitóticas, va presentar baja proporción del núcleo/citoplasma, denominándose segmentación ya que involucra división celular, pero sin afectación al aumento de la masa celular, la masa disminuye un 20%-40% pero el núcleo aumenta su tamaño, los cromosomas conservan intacto el ácido nucleico.

Curso normal

Cuando el cigoto es segmentado desde el polo o cuerpo polar hasta la zona de la reserva del vitelo, por lo general también el surco de división atraviesa la zona donde están los pronúcleos por donde inicia la singamia, consecuentemente tendremos blastómeros.

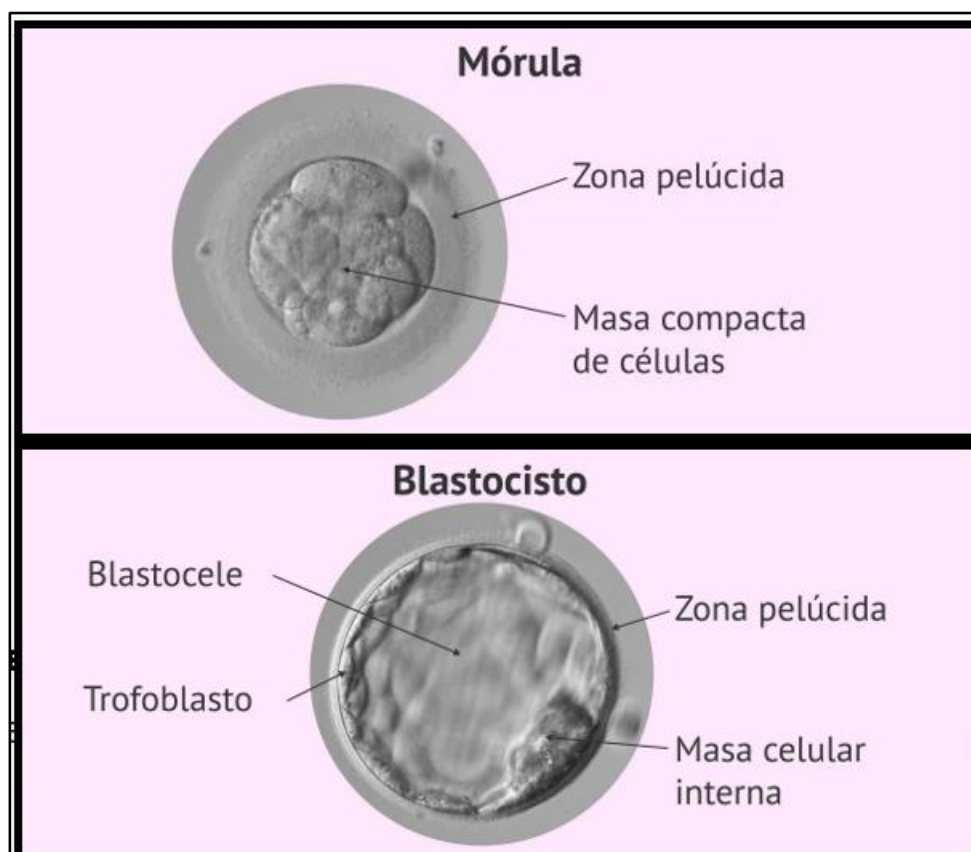
Desarrollo temprano embrionario

Una vez que se compacta la mórula por unión intercelular se da la acumulación de líquido dentro de la cavidad central llamándose el blastocelo. Se logra diferenciar dos grupos celulares una vez que se desarrolla el blastocito. El trofoblasto será la capa de células cuboides periféricas externas las cuales se caracterizarán por densas microvellosidades y serán las

encargadas de captar nutrimentos, luego el trofoblasto concierne la formación del corion. Habrá el segundo grupo celular definido las cuales estarán en un polo bajo las cuales darán al embrioblasto (es una masa de células internas) que originaran las tres capas germinales del embrión conocidas como, endodermo, mesodermo y ectodermo en el proceso de gastrulación. Dicha descripción se la disemina en la siguiente figura 7.

Figura 7

Estructura de mórula y blastocisto.



Nota. Fuente Revista Médica de Reproducción Asistida ORG (2022).

Capítulo III

Materiales y Métodos

Área y ubicación de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Animal del Departamento de Ciencias de la Vida correspondiente a la Universidad de las Fuerzas Armadas Sede Santo Domingo, dicha entidad queda ubicada en el cantón Luz de América km 24 con una latitud de 00°24'44' Sur, una longitud de 78°18'32" Oeste, y altitud de 270 msnm.

Figura 8

Ubicación geográfica del trabajo de Integración Curricular.



Nota. Fuente Trabajo propio.

Ubicación Ecológica

- Altitud: Bosque Húmedo Tropical
- Temperatura: 25°C
- Precipitación: 2860mm por año
- Humedad Relativa: 85%

Materiales

Tabla 2

Materiales, insumos, reactivos y muestras biológicas utilizadas en la investigación.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestras Biológicas
- Vasos precipitados	- Agitador magnético	- Cloruro de Sodio NaCl	- Ovarios de matadero
- Papel absorbente	- Pesa analítica	- Streptomina-Penicilina	- Ovocitos
- Aguja de aspirado 18"	- Bortex	- Cloruro de Potasio KCl	- Pajuelas de semen
- Jeringas de 1-5-10ml	- Baño María	- Bicarbonato de Sodio NaHCO ₃	- ejemplares La Montañesa
- Cajas Petri	- Termómetro	- Aceite Mineral para cultivo celular	- Falcao FIV
- Cajas Nunc tratadas de 4 pocillos	- Cámara de flujo laminar	- Lactato de Sodio	- 018288_GY,
- Puntas de micropipetas	- Platinas térmicas	- TCM 199 10X	- muestra de Barreritos Do Basa GY
- Tubos de ensayo	- Microscopio de contraste de fase	- LH (Hormona Luteinizante)	- BASA 511
- Tubos falcón	- Equipo CASA	- FSH (Hormona Folículo Estimulante)	- Seleon/S exing, muestra
- Tubos eppendorf	- Incubadora de dióxido de carbono	- Insulina	
- Gradillas	- Estufa	- Rojo fenol	
- Pinzas	- Centrifuga	- Heparina	
- Tijera	- Estereomicroscopio	- Gentamicina	
- Espátulas	- Autoclave	- BSA (Albúmina de Suero Bovino)	
	- Bidestilador de agua		
	- Refrigerador		

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestras Bilógicas
- Porta objetos		- SFB (Suero Fetal Bovino)	de Zorro Tango
- Cubre objetivos		- Solución HEPES	Do Morro Go
- Balón de aforo		- Glucosa	1230_P
- Magneto de mezcla		- Glicina	Seleon/S
- Erlenmeyer		- Percol a 90- 40%	exing, Brooke
- Tanque de criopreserv ación		- Fosfato Monopotasico KH ₂ PO ₄	Golowyn GO 3636_AK
		- Fosfato Sódico NaH ₂ PO ₄	Seleon Sexing.
		- Piruvato de Sodio	
		- Cloruro de magnesio hexahidratado MgCl ₂ • 6H ₂ O	
		- Cloruro de calcio dihidratado CaCl ₂ • 2H ₂ O	
		- BME 50X	
		- MEM 100X	
		- Etanol al 90%	
		- Dimetill Sulfoxido	
		- α-Tocoferol	
		- Resveratrol	
		- Agua Ultrapura libre de ARNasas	
		- Agua destilada	
		- Resveratrol ≥99% (HPLC) de Sigma- Aldrich	
		- (±)-α- Tocoferol- T3251 Sigma- Aldrich	

Nota. Fuente Trabajo propio.

Preparación de Soluciones

Solución de transporte

Se pesó 8.5g de NaCl los cuales se diluyó en 100 ml de agua destilada y se adicionó 80µl de Gibco™ Penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml), se agito con ayuda de un agitador magnético y se aforo a 1000ml.

Solución de lavado y aspirado de ovocitos/ Solución Dulbecco 1L

En 100 ml de Agua UltraPure™ sin ADNasa/ARNasa Invitrogen™, se pesó 8g de NaCl, 200mg de KCl, 200mg de KH₂PO₄, 1135mg de NaH₂PO₄, y en el siguiente orden se adicionó 100 mg de cloruro de magnesio hexahidratado y 132mg cloruro de calcio dihidratado, se agregó glucosa 1000mg y 36mg de piruvato. Luego se aforo a los 1000ml. Esta fue la solución base para los posteriores procedimientos de aspirado y lavado.

Solución Dulbecco Enriquecida

De la solución mencionada o base se tomó 100 ml y se agregó 300mg de BSA (50 mg/ml) Invitrogen™ UltraPure™, y se adicionó 100 µl de Gentamicina (50 mg/ml) Gibco™.

Medio de Maduración TCM 1X

En un tubo falcón se puso 9ml de TCM 199-10X, seguido a ello se agregó, 1ml de SFB (Suero Fetal Bovino), 10µl de Gentamicina (50 mg/ml) Gibco™, 10µl de piruvato 0.2 mM, 10µl de LHRH Human (Hormona Leutinizante Humana de la empresa ProSpec), 10µl FSH (Hormona Folículo Estimulante) y 10 µl de epidermal. Una vez que se filtra la solución, se rotulo y se puso a incubar en estufa de CO₂ un tiempo de 2 horas.

Medio SP-Talp

En 50ml de Agua destilada UltraPure™ sin ADNasa/ARNasa Invitrogen, se adicionó cada uno de los compuestos en el siguiente orden: 584.4mg cloruro de sodio (NaCl) 100Mm, 23.1mg de cloruro de potasio (KCl) 3.1 mM, 3.6mg de NaH₂PO₄ 0.3 mM, 29.4mg de cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂ • 2H₂O) 2.0mM, 8.1mg de cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂ • 6H₂O) 0.4 mM, se adicionó 368µl de lactato de sodio a 21.6 mM, 238 mg a 10mM de HEPES, 210mg de bicarbonato de sodio NaHCO₃ a 25mM, y se finalizó agregando rojo fenol 200 µl al 5%, se aforó a los 100ml y se llevó a refrigeración.

Medio SP-Talp enriquecido

En 10ml de solución base de SP-Talp se agregaron 10 µl de Piruvato de Sodio 0.2 µM, se adicionó 10 µl de Gentamicina, BSA-FV 0.06g se esperó a que éste último se diluyera sin agitación y luego de ello se filtró, como último paso se adiciono las respectivas concentraciones de antioxidante.

Medio FERT-Talp

En un vaso de precipitación de 100ml se colocó 50ml de Agua destilada UltraPure™ sin ADNasa/ARNasa Invitrogen, y se fue colocando en orden los respectivos compuestos: 666mg cloruro de sodio (NaCl) 114Mm, 23.8mg de cloruro de potasio (KCl) 3.2 mM, 4.8mg de NaH₂PO₄ 0.4 mM, 24.4mg de cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂ • 2H₂O) 2.0mM, 10mg de cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂ • 6H₂O) 0.5 mM, se adicionó 187µl de lactato de sodio a 10 mM, 238 mg a 10mM de HEPES, 210mg de bicarbonato de sodio NaHCO₃ a 25mM, y se finalizó agregando rojo fenol 200 µl al 5%, se aforó a los 100ml y se llevó a refrigeración.

Medio FERT-Talp enriquecido

Se tomaron 10ml del medio base de FERT-Talp, se adicionó 10 μ l de piruvato de sodio al 0.2 μ M, luego de ello 10 μ l de Gentamicina y 0.06g de BSA-FBV, el cual y de la misma manera que el medio de SP-Talp, se esperó a que se diluyera sin agitación y luego se pasó al proceso de filtrado, como último paso se adicionó las concentraciones de antioxidante respectivo.

Solución de capacitación de espermatozoides – Gradiente de Percoll al 90%

Se tomó 9ml de Percoll puro, luego se agregó 1 ml de SP-Talp 10x, se incorporó 21mg de carbonato ácido de sodio, 36.8 μ l de lactato de sodio, y por último 10 μ l de piruvato de sodio al 1.0 μ M.

Solución de capacitación de espermatozoides – Gradiente de Percoll al 45%

En un tubo Eppendorf se adicionó 500 μ l de solución SP-Talp sin enriquecer y 500 μ l de percoll al 90%.

Solución SOFT 4M o medio de maduración de cigotos

Para esta solución se empleó Agua destilada UltraPure™ sin ADNasa/ARNasa Invitrogen, en un Erlenmeyer con 10ml de agua se fueron aplicando los siguientes compuestos: cloruro de sodio 672.5 μ l, cloruro de potasio 179 μ l, NaH₂PO₄ 297.5 μ l, glucosa 250 μ l, glutamina 250 μ l, glicina 250 μ l, 50 μ l BME 50X, 250 μ l MEM 100X, 25 μ l de insulina, 37.5 μ l piruvato de sodio, 11.75 μ l de lactato de sodio, 42.75 μ l de cloruro de calcio dihidratado, 122.5 μ l cloruro de magnesio hexahidratado, 0.0525g, esto se filtró y se aforo a 25ml.

Solución Stock y disolución en concentraciones de 0.5-10 μ M de Antioxidante Resveratrol

Al ser un compuesto liofilizado se hizo el respectivo cálculo, y se tomó en cuenta para la solución base, se pesó 10mg de Resveratrol $\geq 99\%$ (HPLC) de Sigma-Aldrich, del cual se diluyó en 1ml dimetill sulfoxido y se obtuvo una primera concentración, de esta primera solución se toma 10 μ l y se diluyó en 1ml de dimetill sulfoxido y se alcanzó una concentración de 1000 μ M lo que vendría a ser la segunda solución base. De esta segunda dilución con antioxidante solo se tomó 5 μ l y se adicionó en 10ml de medios (TCM, SP-Talp, FERT-Talp, SOFT-Trabajo) alcanzando la concentración de 0.5 μ M. En cambio, para alcanzar una concentración de 10 μ M se tomó 100 μ l.

Solución Stock y disolución en concentraciones de 0.5-10 μ M de Antioxidante α -Tocoferol

Se preparó una solución base, se 0.052g del reactivo por peso analítico de una gota, ya que el reactivo tenía presentación líquida, el cual se diluyó en 10ml de etanol al 96%, y se obtuvo con los respectivos cálculos una concentración de 11500 μ M, después de ello se tomaron de esa primera solución base 43.48 μ l para diluir en 5ml de medios (TCM, SP-Talp, FERT-Talp, SOFT-Trabajo) para obtener una concentración de 100 μ M, y luego se obtuvo una concentración de 200 μ M tomando 87 μ l y adicionando en 5ml de cada uno de los medios.

Metodología***Trasporte y lavado de Ovarios***

Los ovarios se trasportaron bajo medidas asépticas, una vez recolectados de las hembras faenadas con diversidad de origen y raza, se trasportaron del matadero Municipal de Santo Domingo de los Tsáchilas al Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal (LBRA) de la Universidad de las Fuerzas Armadas T° (Temperatura) de transporte fue de 37°C.

Al llegar los ovarios al LBRA, fueron sometidos a una nueva solución de lavado temperada a 37°C y fueron extraídos los anexos o cuernos uterinos de aquellos que lo contenían.

Diariamente durante el proceso de experimentación se realizó una recolecta de entre ± 80 y 100 ovarios.

Aspirado de ovocitos

Previo a la aspiración se colocaron tres cajas de Petri con solución Dulbecco enriquecida y una que sería el lavado final con medio de maduración TCM 1X sin antioxidante, todas ellas puestas en platina térmica de 37°C.

Para la aspiración se secó los ovarios a medida que se iban seleccionando para el aspirado, esto se realizó con toallas absorbentes estériles, y con jeringa de 10ml y una aguja de aspirado de 18" G se tomó 1ml de solución Dulbecco enriquecida y se procedió al aspirado folicular, se tomaron en cuenta folículos de entre 4mm y 8mm como lo recomendaba la bibliografía, cada aspirado contaba con un volumen de llenado de los 10ml. El líquido folicular fue añadido a una primera caja de Petri para proceder al lavado y selección de ovocitos.

Lavado y selección de ovocitos a madurar

Para la selección y lavado de ovocitos se lo realizó bajo parámetros térmicos y asépticos adecuados, y se hizo la selección de los ovocitos tomando en cuenta las mejores características anteriormente mencionadas en la Figura 5 y la bibliografía de (García Jorge et al., 2017).

Una vez que realizó el lavado y selección de los ovocitos, se puso en cada pocillos de las placa Nunc 250 µl de medio TCM 1X previamente incubado por dos horas, en cada gota se

introdujo una cantidad entre 25-40 ovocitos por pocillo, distribuidos en pocillo 1 de la placa Nunc el T₀ (Tratamiento control), en pocillo 2 el T₁ (en Resveratrol 0.5 μM), en pocillo 3 el T₂ (Resveratrol 10 μM), de igual manera se procedió cuando se utilizó el antioxidante tocoferol en el pocillo 1 se puso el T₀ (Tratamiento control), en el pocillo 2 el T₁ (Tocoferol 100 μM) y en el último pocillo el T₂ (Tocoferol 200 μM). Se dejó en la incubadora de CO₂ por un tiempo de 24h, a 38°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂

El porcentaje de los ovocitos viables se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad de ovocitos} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de ovocitos viables} * 100}{\text{N}^\circ \text{ total de ovocitos obtenidos}}$$

Fertilización de ovocito y capacitación de esperma

Una vez transcurridas las 24h de incubación en medio de maduración, los ovocitos fueron pasados a una caja Nunc con medio FER-Talp enriquecido y suplementado con las concentraciones descritas anteriormente de antioxidantes, tanto de resveratrol como para tocoferol, el cual fue previamente incubado por un periodo mínimo de dos horas; los ovocitos fueron llevados a incubadora de CO₂ con los valores antes descritos.

Antes de la fertilización se preparó la muestra seminal, se descongeló la pajuela y se evaluó la motilidad en el equipo CASA, posteriormente se preparó la solución de percoll al 90% y 45%, las dos soluciones fueron agregadas en un tubo falcon y se puso 500 ul de semen entre las dos fases de percoll, se centrifugo a 500 rpm por 25 minutos, luego se retiró el sobrenadante y el pellet se puso en solución Sp. Talp enriquecida y se centrifugo a 500 rpm por 6 minutos. Luego, se eliminó el sobrenadante y se puso el pellet en solución Fer-Talp y se agregó 5 ul de Heparina

Se añadió 75 µl de solución Fert-Talp + espermatozoides + heparina, luego se agregó 20 ovocitos en cada pocillo, se cubrió con 250 µl de aceite mineral y se dejó incubar 24h en cámara de CO₂ al 5%, a 38°C y 90% de humedad relativa.

Denudamiento de ovocitos

En el proceso de denudamiento de los posibles cigotos se realizó a las 24 horas de haber hecho la fertilización, el método para denudamiento fue el pipeteo, los cigotos fueron pasados a cajas Nunc con solución SOF 4M más las concentraciones de antioxidante y previamente incubada, se recubrió con 250 µl de aceite mineral y se dejó a incubación en la cámara de CO₂ al 5% a 98°C y 90% de humedad relativa.

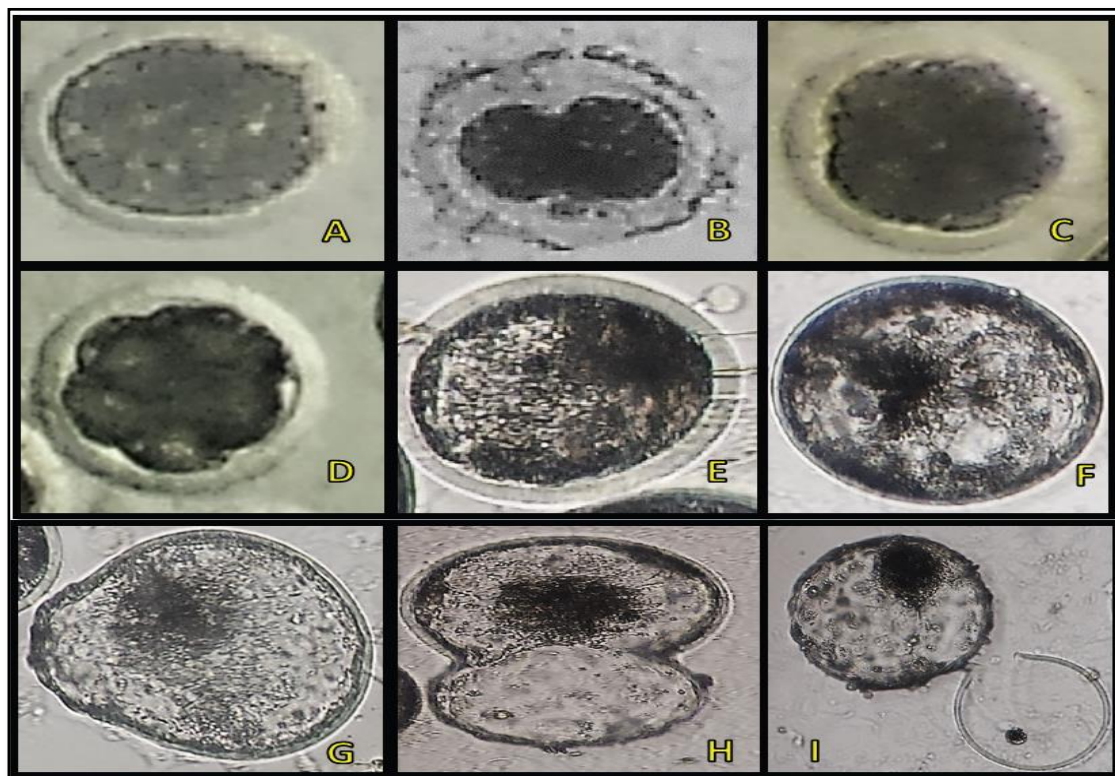
Los posibles embriones fueron evaluados pasado las 72h hasta llegar al día 6 de su respectivo cultivo, examinando su desarrollo y morfología celular; el porcentaje de viabilidad de los blastocistos se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Blastocistos} = \frac{N^{\circ} \text{ de cigotos denudados}}{N^{\circ} \text{ de blastocistos}}$$

Para la selección de blastocistos se tomó en cuenta el método visual guiado por las siguientes características descritas en la Figura 10.

Figura 9

Formación de embrión con relación al tiempo de cultivo.



Nota. La imagen "A" presenta un ovocito no fecundado, la "B" a un ovocito con división de 2 células, el recuadro "C" se aprecia una mórula a las 72 horas de cultivo, la "E" se visualiza un blastocisto temprano a los 5 días, la "F" a un blastocisto ya completado su desarrollo para ser implantado en la matriz de la hembra bovina a los 6 día o 7 días de desarrollo, en la "G" ya se puede apreciar un blastocisto expandido, en la "H" el blastocisto ya está eclosionado y expandido ocurre a los 8 y 9 días de cultivo, en la "I" el blastocisto ya ha eclosionado de la zona pelúcida 9 días. Fuente: Manual de Procedimientos para la Reproducción y Vitricación de Embriones Bovinos en Laboratorio de Reproducción Animal (García Jorge et al., 2017).

Diseño experimental y análisis estadístico del estudio

En la investigación de producción *in vitro* de embriones bajo el efecto de antioxidantes Resveratrol y α -Tocoferol (Vitamina E) obtenidos a partir de ovarios de matadero, se tuvo como objetivo implementar dos concentraciones por cada antioxidante. En cada uno de los procesos de la producción, maduración de ovocitos, fertilización de ovocitos y el cultivo de embriones. Las unidades (embriones) tomadas en cuenta para la evaluación estadística fue embriones en fase temprana, los cuales fueron obtenidos en el proceso experimental. Todos los datos fueron analizados mediante el software estadístico R Statistics. Las normalidades se verificaron mediante la prueba Tuckey donde se utilizó los residuos de los datos, como referencia a la homogeneidad del estudio, la diferencia significativa entre antioxidantes, y para las concentraciones se empleó un ANOVA anidado y diseño de una vía.

C pulo IV

Resultados y Discusión

Se recolectó 800 ovarios, por tres los días lunes, martes y miércoles, en la tabla 3 se utilizó 525 ovarios usados en la fase experimental con resveratrol, el número de oocitos recolectados fue de 482 y se seleccionó 389 oocitos, mientras, que en la fase experimental con tocoferol se us  un total de 476 ovarios, y se colectó 556 ovocitos y fueron seleccionados un total de 495 ovocitos.

Tabla 3

Cantidad de ovocitos recolectados.

Réplicas Resveratrol	Ovarios	N� de ovocitos recolectados	N� de ovocitos seleccionados
1	116	80	59
2	92	92	70
3	116	98	87
4	117	123	98
5	84	89	75
Replicas Tocoferol			
1	95	121	110
2	90	125	110
3	86	92	80
4	100	86	75
5	105	132	120

Nota: Los ovarios fueron extraidos del Centro de Faenamieto Regional en Santo Domingo de los Tsáchilas, Los ovocitos fueron aspirados de folículos que tenían un diámetro entre 0,4 mm y 18 mm, por tal motivo el número de ovocitos recolectados varían en cada réplica.

Sin embargo, en un estudio realizados por (Estrella et al., 2017) la aspiración de los ovocitos lo realizaron de folículos que presentaban un diámetro de 4 mm a 8 mm y el número de ovocitos fue uniforme.

La selección de los ovocitos se realizó tomando en cuenta los criterios de clasificación de (García Jorge et al., 2017) donde se destacan los Grados I y II, los ovocitos de grado I presentaron tres capas de células cumulus, un citoplasma homogéneo y presentaban granulocitos finos, los ovocitos de Grado II, presentaban 3 capas de células de cúmulos, granulocitos del citoplasma con dispersión heterogénea con una concentración céntrica y claridad en la zona pelúcida.

Maduración de Ovocitos

En el estudio de maduración de ovocitos con Tocoferol se obtuvieron los siguientes datos para el tratamiento T0 el porcentaje de ovocitos viables fue del 76,58%, el T1 generó un porcentaje de ovocitos viables de 88,89%, mientras tanto, el T2 produjo un 87,5% de ovocitos.

Tabla 4

Resultados Maduración de Ovocitos con influencia de Tocoferol. Fuente de trabajo propio.

Tratamiento s	Repetición	N° ovocitos cultivado s	N° ovocitos no madurado s	N° ovocitos madurado s	Total de ovocito s FIV	% Viabilidad
T ₀	sin tocofero l	R1	34	11	23	76,58
		R2	34	6	28	
		R3	25	6	19	
		R4	25	5	20	
		R5	40	9	31	
		Total	158	37	121	
		N° ovocitos cultivado s	N° ovocitos no madurado s	N° ovocitos madurado s		
	R1	38	3	35	35	
	R2	38	0	38	38	
	R3	30	2	28	28	88,89

T₁:	100 µM	R4	25	6	19	19	
		R5	40	8	32	32	
		Total	171	19	152	152	
		Repetición	N° ovocitos cultivados	N° ovocitos no madurados	N° ovocitos madurados		
T₂:	200 µM	R1	38	2	36	36	
		R2	37	1	36	36	
		R3	25	2	23	23	87,5
		R4	25	8	17	17	
		R5	43	8	35	35	
		Total	168	21	147	147	

Nota. El tratamiento que más ovocitos maduros produjo fue de T₁ con un total de 152, solo 19 ovocitos no llegaron a la fase de maduración.

En relación con la maduración con resveratrol, se obtuvieron los siguientes resultados: para el T₀ el porcentaje de ovocitos viables fue 68.99%, el T₁ generó un porcentaje de ovocitos viables de 82.95%, mientras que el T₂ produjo un 82.44% de viabilidad de ovocitos, lo que se muestra a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5

Resultados obtenidos maduración ovocitos con Resveratrol

Tratamientos	Repetición	Ovocitos cultivados	Ovocitos no madurados	Ovocitos madurados	Total ovocitos FIV	% Viabilidad	
T₀:	sin resveratrol	R1	23	7	9	9	
		R2	23	4	19	19	
		R3	28	7	21	21	68,99
		R4	30	10	20	20	
		R5	25	5	20	20	
		Total	129	33	89	89	
	Repetición	Ovocitos cultivados	Ovocitos no	Ovocitos madurados	Total FIV		

		madurados				
T1:	0,50 μM	R1	17	5	12	82,95
		R2	23	2	21	
		R3	30	5	25	
		R4	34	6	28	
		R5	25	4	21	
		Total	129	22	107	
		Repetición	Ovocitos cultivados	Ovocitos no madurados	Ovocitos madurados	Total FIV
T2:	10 μM	R1	19	5	12	82,44
		R2	24	1	23	
		R3	29	9	20	
		R4	34	4	30	
		R5	25	2	23	
		Total	131	22	108	

Nota. El T₁ de 0.50 μ M resultó ser la mejor concentración con un total de 107, siendo solo 22 ovocitos no fueron viables.

Tabla 6

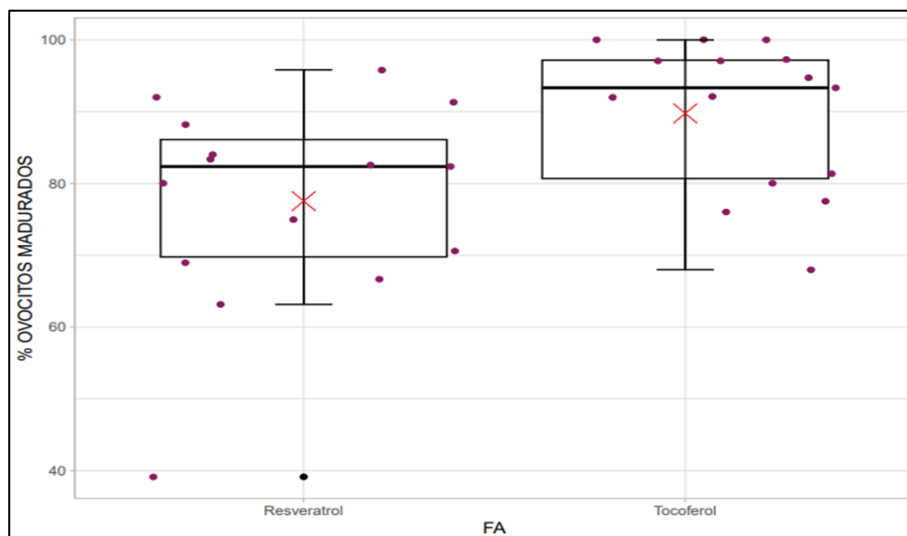
Análisis de porcentaje de ovocitos obtenidos.

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
FA: ANTIOXIDANTE	1120	1	1120.1	7.348	0.0122
FA:FB	753	4	188.2	1.234	0.3228
Error	3658	24	152.4		

Nota. En el análisis estadístico se observa que existe diferencia significativa para el Factor A, que corresponde al antioxidante utilizado, mientras tanto no existe significativa para las concentraciones utilizadas.

Figura 10

Porcentaje de ovocitos respecto a la aplicación de los antioxidantes Resveratrol y Tocoferol



Nota. La Figura 11 señala las medias alcanzadas al utilizar los antioxidante tocoferol y resveratrol en I maduración de los ovocitos. La media más alta corresponde a Tocoferol con un porcentaje de maduración de ovocitos de 89.77% seguido por el resveratrol con un valor 77.55%. Como se puede observar en la tabla 7. El mejor rendimiento se obtuvo al utilizar el tocoferol como antioxidante en la maduración de los ovocitos. Fuente *Trabajo propio (2023)*.

Tabla 7

Análisis media maduración de ovocitos respecto a influencia de Antioxidantes Resveratrol y Tocoferol.

ANTIOXIDANTE	% OVOCITOS MADUROS
TOCOFEROL	89.77 A
RESVERATROL	77.55 B

Nota. Fuente autoría propia (2023).

Tabla 8

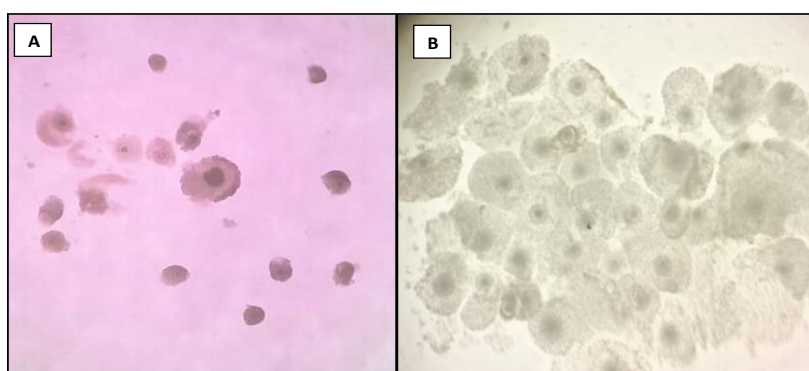
Análisis de media respecto al subgrupo concentración de Antioxidantes Resveratrol y Tocoferol

CONCENTRACIÓN	% OVOCITOS MADUROS
100 μM	88.29 A
0.5 μM	82.64A
200 μM	86.68 A
10 μM	81.64 A
control	73.50 B

Nota. En la Tabla 8, se observa que no existe diferencia entre las concentraciones de tocoferol y resveratrol, sin embargo, es diferente las medias de los antioxidantes con el control, es decir se obtienen mejores rendimientos utilizando los antioxidantes en la maduración de los ovocitos. Se debe destacar que es el tocoferol en concentración 100 μ M se obtiene el más alto rendimiento de ovocitos maduros seguido por la concentración 200 μ M que corresponde al antioxidante tocoferol. Fuente autoría propia (2023).

Figura 11

Ovocitos maduros con Tocoferol a las 24h de incubación.

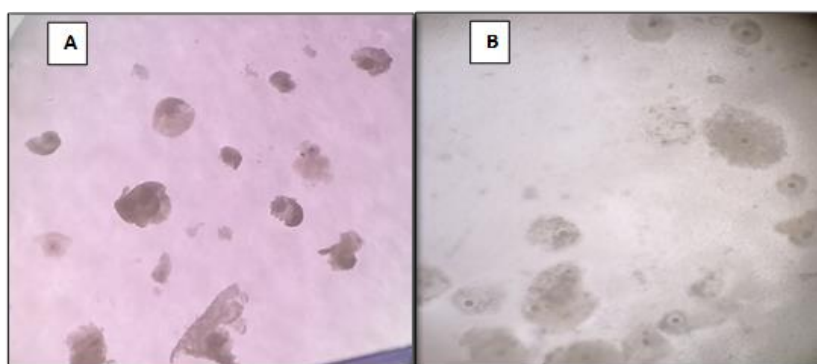


Nota. La Figura A se observa los ovocitos recolectados y depositados en solución de maduración que contiene α -Tocoferol. La Figura B muestra la acción del tocoferol en concentración 100 μ M una vez transcurrido las 24h del periodo de maduración, la temperatura de incubación fue de

38°C, la humedad relativa de 90% y 5% de CO₂. Además, en la Figura B se puede apreciar que las capas de las células del cumulus de los ovocitos aumentaron al comparar con los ovocitos de la Figura A. Fuente autoría propia (2023).

Figura 12

Resultados de la maduración de ovocitos con concentración 0.5 µM de resveratrol.



Nota. En la imagen A se aprecian los ovocitos recolectados y depositados en medio de maduración que contenía el antioxidante resveratrol en una concentración de 0,5 µM antes del proceso de incubación. La Figura B presenta el aumento de las células del cúmulus de los ovocitos que han culminado el proceso de maduración luego de 24h con los valores de temperatura, humedad relativa y CO₂ igual que la Figura 12. Fuente autoría propia (2023).

En un estudio reciente (Acosta, 2021) analizó la influencia del α -Tocoferol en la maduración de ovocitos de grado I-IV con una concentración de 100 µM, el resultado más importante que obtuvo fue, que los ovocitos de grado I y II aumentaron en un número mayor de células del cúmulus, este resultado concuerda con los valores obtenidos en el presente estudio, cuando se cultivó ovocitos con 100 µM y se obtuvo el porcentaje más alto de maduración que correspondió al 89.77%. En otra investigación (Vásquez et al., 2014), utilizó el ácido ascórbico y el tocoferol en concentración 100 µM, evidenció que esta esta combinación de antioxidantes

redujo las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la etapa de maduración de los ovocitos, se sabe que los antioxidantes efectivamente disminuyen ROS porque bloquean a los radicales libres. En el presente estudio observamos como el tocoferol generó una mayor cantidad de ovocitos maduros posiblemente debido a que este antioxidante bloquea a los radicales libres que impiden la madurez de los ovocitos.

Por otro lado (Olson & Seidel, 2000) estudiaron, la vitamina E y el ácido ascórbico en una concentración 100 μ M, encontraron que el cultivo de ovocitos, el número de cigotos y el número de blastocistos disminuyeron al utilizar esta combinación de antioxidantes, no así cuando utilizaron solo α -tocoferol aumento en un 17% la maduración de ovocitos, la fertilización, la producción de cigotos y blastocistos. En la presente investigación el uso de tocoferol de manera individual permitió alcanzar un porcentaje elevado de ovocitos maduros, lo cual concuerda que la investigación de (Olson & Seidel, 2000) al utilizar en combinación de antioxidante no obtuvieron porcentajes adecuados de madurez, hay la necesidad de seguir investigando si la combinación de antioxidantes genera efectivamente un número menor de ovocitos, cigotos y blastocistos.

Maduración de Blastocistos

En la Tabla 9 se presenta la influencia de Tocoferol en la producción de blastocistos, se evidencia que el T₀ produjo 20.40% de blastocistos viables que corresponde a 30 blastocistos de un total de 147 cigotos desarrollados, continúa el T₂ con el 37% de blastocistos formados, sin embargo, el número de blastocistos mayor fue generado por el T₁ que corresponde al tocoferol con una concentración de 100 μ M, el número de blastocistos que genero esta concentración fue del 47.36% es decir, que 72 blastocistos de un total de 152 llegaron a desarrollarse completamente.

Tabla 9

Resultados de blastocistos con tocoferol

Tratamiento	Repetición	N° blastocistos	N° cigotos	Ovocitos no fecundados	Total	Porcentaje total	
T0:	Sin Tocof	R1	8	10	15	33	
		R2	7	8	18	33	
		R3	4	14	7	25	20.40%
		R4	4	14	7	25	
		R5	7	16	8	31	
		Total	30	62	55	147	
T1:	100 μ M	R1	16	15	4	35	
		R2	17	11	10	38	
		R3	15	7	6	28	47,36
		R4	9	7	3	19	
		R5	15	10	7	32	
		Total	72	50	30	152	
T2:	200 μ M	R1	13	12	11	36	
		R2	11	13	7	31	
		R3	8	9	6	23	37%
		R4	7	4	6	17	
		R5	13	15	7	35	
		Total	52	53	37	142	

Nota. En la Tabla 9 se presentan los resultados de los tratamientos obtenidos con α -Tocoferol, donde T₁ resultó ser el mejor tratamiento generando el 47.36%.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de los blastocistos viables con resveratrol, el T₀ fue el tratamiento que menos blastocistos generó de 94 cigotos solamente 24 llegaron a blastocistos, el T₂ dio de un total de 46 blastocistos de un total de 135, finalmente T₁ fue el tratamiento con el mayor número de blastocistos 55 de 129.

Tabla 10

Número de blastocistos obtenidos con resveratrol a distintas concentraciones.

Tratamientos	Repetición	N° Blast.	N° morulas	Ovocitos no fecundados	Total	Porcentaje total
T ₀ : sin resveratrol	R1	3	6	7	16	25.53%
	R2	7	7	3	17	
	R3	4	12	5	21	
	R4	6	10	4	20	
	R5	4	14	2	20	
	Total	24	49	21	94	
T ₁ : 0,50 µM	R1	9	5	3	17	42.63%
	R2	11	6	6	23	
	R3	12	10	8	30	
	R4	11	15	8	34	
	R5	12	9	4	25	
	Total	55	45	29	129	
T ₂ : 10 µM	R1	7	8	4	19	34.07%
	R2	8	10	6	24	
	R3	10	13	6	29	
	R4	12	20	2	34	
	R5	9	14	6	29	
	Total	46	65	24	135	

Nota. La Tabla 10 presenta el número de blastocistos viables obtenidos con resveratrol, con el T₀ se obtuvo un porcentaje de blastocistos de 25.53%, seguido por el T₂ que presentó un porcentaje de 34.07%, mientras que T₁ fue el tratamiento que demostró ser el mejor con un 42.63%.

Tabla 11

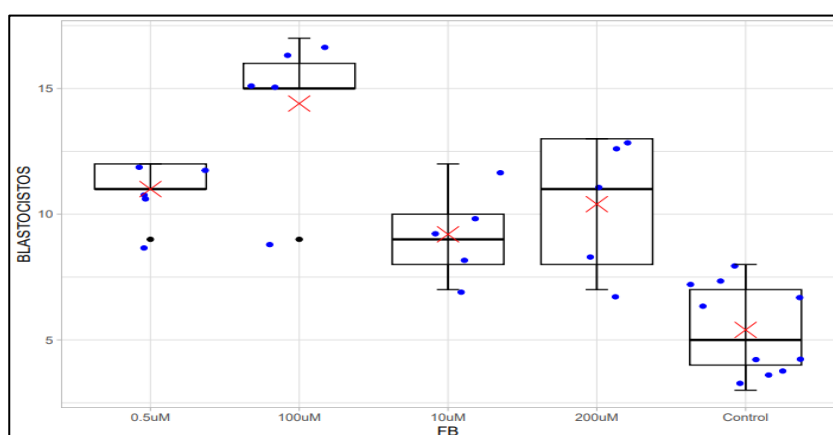
Análisis estadístico de antioxidantes en el desarrollo de blastocistos

Efecto	Suma de cuadrados	GL	Cuadrados medios	F-valor	P-valor
FA : ANTIOXIDANTE	28.03	1	28.03	5.80	0.0241
FA:FB	278.27	4	69.57	14.39	0.00000398
Error	116.00	24	4.83		

Nota. En la Tabla 11 se observa que existe diferencia significativa en el Factor A, mientras que la diferencia es altamente significativa en el subfactor que corresponde a la concentración de resveratrol y α -tocoferol.

Figura 13

Representación gráfica de las medias de los antioxidante resveratrol y tocoferol en el desarrollo de los blastocistos.



Nota. La Figura 14 representa las medias alcanzadas al utilizar el α -tocoferol (100-200 μ M) y resveratrol (0.5-10 μ M). La media más alta en la producción de blastocistos corresponde a la concentración 100 μ M de tocoferol seguido de 0.5 μ M de resveratrol, el control presenta la media más baja en producción de blastocistos. Fuente trabajo propio (2023).

Tabla 12

Análisis medios de acuerdo a las concentraciones de antioxidantes.

CONCENTRACIÓN	BLASTOCISTOS
100 μM	14.4 A
0.5 μM	11.0 AB
200 μM	10.4 AB
10 μM	9.2 B
control	5.4 C

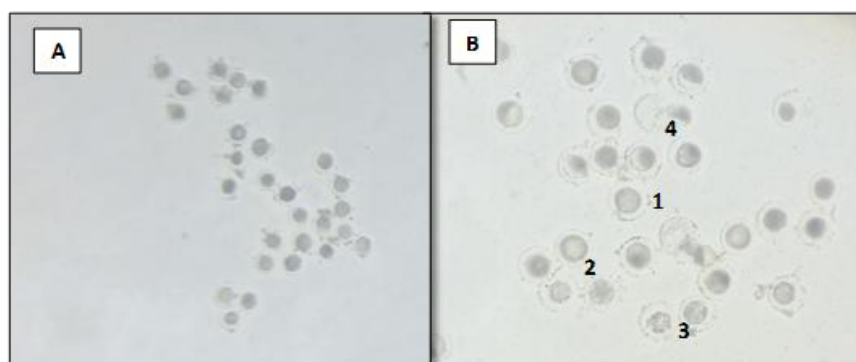
Nota. Existen diferencias entre las concentraciones de tocoferol, resveratrol y el control, se destaca que la concentración 100 μM de tocoferol produjo el número de blastocistos más importantes seguido por la concentración de resveratrol 0.5 μM , el control fue el tratamiento que menos número de blastocistos produjo.

En un estudio realizado por (Escobar, 2021) demostró el efecto del resveratrol en una concentración 0.5 μM sobre el desarrollo de los embriones producidos a partir de ovocitos recolectados de ovarios de matadero y de ovocitos recolectados de ovarios *in vivo* a partir de la técnica *Ovum pickup*, los datos exhibieron un porcentaje alto de embriones a partir de ovocitos extraídos de ovarios de matadero cuya solución contenía 0.5 μM de resveratrol, estos datos coinciden con nuestro estudio que en solución 0.5 μM obtuvimos 42.36% de blastocistos viables.

En el mismo ámbito Madrid et al., 2019 realizaron estudios de resveratrol en el desarrollo de embriones bovinos, las concentraciones utilizadas fueron (0, 0.2, 0.5, 1, 5, 10 μM), el resultado trascendental determinó que la acción del resveratrol fue alta cuando la concentración de esta antioxidante fue de 0.2 a 1 μM estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos en el presente estudio. Pues el resveratrol tiene una mejor con la concentración es baja, se desarrolla los ovocitos, se desarrolló un mayor número de cigotos y por ende un mayor número de blastocistos como hemos expuesto en los resultados anteriores.

Figura 14

Desnudamiento de ovocitos fecundados y resultados blastocistos



Nota. En la imagen A se aprecia el desnudamiento a las 24 horas de maduración de ovocitos fecundados, mientras que en la imagen B se aprecia el desarrollo de blastocistos a los 5 días de cultivo con α -Tocoferol, donde se aprecia evaluación de calidad morfológica embrionaria propuesta por la IETS donde los blastocistos son clasificados en escala del 1 al 4. Se visualiza el grado 1 expresado como estado Excelente o Bueno, con una masa embrionaria esférica y homogénea, sus blastómeros se ven uniformes conforme al tamaño, su color y densidad; al menos su integridad está dentro del 85%. El grado 2 es un estado Regular, presenta irregularidades de al menos el 50% descritas con características moderadas en forma, tamaño, color y densidad de sus células. Grado 3 y estado Malo, tiene muchas irregularidades en su forma y tamaño de masa embrionaria, presenta el 25% de su material celular integro y corresponde aun así con una masa embrionaria viables. Por último, el grado 4 con estado Muerto o en degeneración, su masa embrionaria tiene blastómeros en desorden, irregularidades mayoritariamente visibles al menos el 85% de su material celular se encuentra desintegrado (García Jorge et al., 2017).

Capítulo V

Conclusiones

El uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones bovinos mejora la maduración de ovocitos, la fertilización in vitro y la formación de blastocistos, siendo el Tocoferol el antioxidante que brindo mejores resultados en las tres fases antes mencionadas.

El α -Tocoferol a una concentración de 100 μ M produjo 88.89% de ovocitos maduros y 47.36% de blastocistos este porcentaje es óptimo en la producción de embriones bovinos in vitro.

El resveratrol en una concentración de 0.5 μ M generó el 82.95% de ovocitos maduros y blastocistos en un 42.63%, estos datos coinciden con la mayoría de estudios similares.

Recomendaciones

Realizar estudios del uso de α - tocoferol y resveratrol combinados en concentraciones bajas con el fin de entender y comparar el rendimiento con estudios de antioxidantes que han sido reportados de manera individual.

Hacer investigaciones de α - tocoferol y resveratrol en concentraciones bajas pero dispuestos directamente en las soluciones de cultivo más no en la solución madre.

Bibliografía

- Acosta, P. (2021). *Evaluación de la quercetina y α -tocoferol en la maduración in vitro de ovocitos de bovino y su desarrollo embrionario* [Mestría en Ciencia Animal]. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez.
- Block, J., Hansen, P. J., Loureiro, B., & Bonilla, L. (2011). Improving post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, 76(9), 1602–1609. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.025>
- Castañeda Martínez, L., & Martínez, C. (2009). *Fisiología de la reproducción bovina: desde la fecundación hasta la implantación embrionaria*. Citación recomendada. https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinariaL.
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., & Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, 320(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>
- Estrella, C. A., Suconota, A. G., & Ayala, L. E. (2017). *Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes*. <https://doi.org/10.1016/S1472>
- García Jorge, Restrepo, S., Sánchez, N., Moreno, E., Dubeibe, D., & Mogollón, E. (2017). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA REPRODUCCION Y VITRIFICACION DE EMBRIONES BOVINOS EN LABORATORIO DE REPRODUCCION ANIMAL*.
- Gonella, M., Atuesta, E., Bernal, S., & Chacón, L. (2013). *Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro*. file:///C:/Users/ASUS/Downloads/Dialnet-GeneralidadesDeLaProduccionDeEmbrionesBovinosInVit-6285691.pdf
- Gupta, M. K., Uhm, S. J., & Lee, H. T. (2010). Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2602–2607. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.043>
- Guzmán, L., Mestanza, M., Inoue, N., Nuñez, D., Portella, J., & Luis Noriega-Hoces, ; (2016). Maduración In Vitro de ovocitos con cultivo extendido hasta estadio de blastocitos. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322016000400013
- Hafez, B., & Hafez, E. S. E. (2002). *REPRODUCCIÓN E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN ANIMALES* (E. S. e Hafez & B. Hafez, Eds.; 7 ma edición).
- Hernandez, A., Góngora, A., Jiménez, C., Rodríguez, J., Prieto, E., Chacon, L., & Escobar, F. (2008). *Reproducción en la vaca: fisiología y aplicaciones*.
- International Embryo Technology Society's, & Joao, V. (2021). 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newslette*.

- Leidenfrost, S., Boelhaeve, M., Reichenbach, M., Güngör, T., Reichenbach, H.-D., Sinowatz, F., Wolf, E., & Habermann, F. A. (2011). Cell Arrest and Cell Death in Mammalian Preimplantation Development: Lessons from the Bovine Model. *PLoS ONE*, *6*(7), e22121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022121>
- Looney, C. R., Lindsey, B. R., Gonseth, C. L., & Johnson, D. L. (1994). Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, *41*(1), 67–72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80050-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80050-0)
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2019). “ADQUISICION DE EMBRIONES BOVINOS DEL PROYECTO NACIONAL DE GANADERIA SOSTENIBLE.” www.mag.gov.ec
- Olson, S. E., & Seidel, G. E. (2000). Culture of In Vitro-Produced Bovine Embryos with Vitamin E Improves Development In Vitro and After Transfer to Recipients¹. *Biology of Reproduction*, *62*(2), 248–252. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.248>
- Piras, A. R., Ariu, F., Falchi, L., Zedda, M. T., Pau, S., Schianchi, E., Paramio, M., & Bogliolo, L. (2020). Resveratrol treatment during maturation enhances developmental competence of oocytes after prolonged ovary storage at 4 °C in the domestic cat model. *Theriogenology*, *144*, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.009>
- Rodríguez, C. F., Riera, J., Tovar, O., & Morales, A. (2018). Efecto del estrés calórico y el estrés oxidativo en la función espermática de los mamíferos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, *12*(1). <https://doi.org/10.5209/rccv.61018>
- Sikka, S. C. (2004). Andrology Lab Corner*: Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal of Andrology*, *25*(1), 5–18. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.x>
- Toribio, L. (2013). “COMPENDIO SOBRE REPRODUCCIÓN ANIMAL.”
- Vásquez, N. A., Torres, V., & Rojano, B. A. (2014). Efecto del ácido ascórbico durante maduración in vitro de oocitos bovinos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y competencia para el desarrollo embrionario. *Informacion Tecnologica*, *25*(2), 141–150. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000200016>
- Wang, Y., Zhang, M., Chen, Z.-J., & Du, Y. (2018). Resveratrol promotes the embryonic development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *54*(6), 430–438. <https://doi.org/10.1007/s11626-018-0262-6>
- ZHONG, R., & ZHOU, D. (2013). Oxidative Stress and Role of Natural Plant Derived Antioxidants in Animal Reproduction. *Journal of Integrative Agriculture*, *12*(10), 1826–1838. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60412-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60412-8)
- Zullo, G., Albero, G., Neglia, G., de Canditiis, C., Bifulco, G., Campanile, G., & Gasparrini, B. (2016). L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology*, *85*(4), 688–697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.008>