



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Sede
Santo Domingo**

Estudio de la maduración de oocitos con resveratrol a partir de Folículos de Graff de 0,3-20 mm de diámetro

Autora: Deivis Alejandro Tandazo Cerón

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Trabajo de Integración Curricular previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Tutor: Carrera Garces, Fredy Patricio Ph.D

Santo Domingo - Ecuador
2023



Assisted reproductive technologies (ART):

Inseminación artificial, transferencia de embriones, PIV de embriones, superovulación y colecta de ovocitos, criopreservación, semen sexado y Transferencia nuclear de células somáticas (clonación) (Ciani et al., 2021).



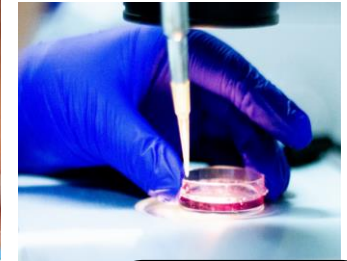
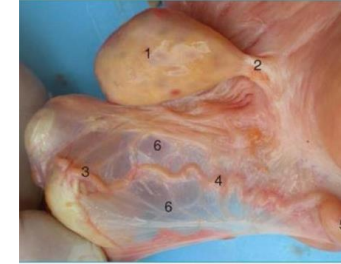
El objetivo principal de estas herramientas es maximizar el número de crías de animales genéticamente superiores y difundir germoplasma en todo el mundo (Ferré et al., 2020).



óvulos de vacas + espermatozoides → fuera del cuerpo de los animales → embrión

La PIV de embriones: maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, fertilización *in vitro* (FIV) así como desarrollo embrionario *in vitro* (IVD)

90% de los ovocitos llegan con éxito a la etapa de Metafase II, cerca del 80% son fertilizados *in vitro*, y de estos, cerca del 50% se vuelven blastocistos (Ciani et al., 2021). Entre el 20% y el 40% de los presuntos cigotos cultivados alcanzarán la etapa de blastocisto (Ferré et al., 2020)



MIV

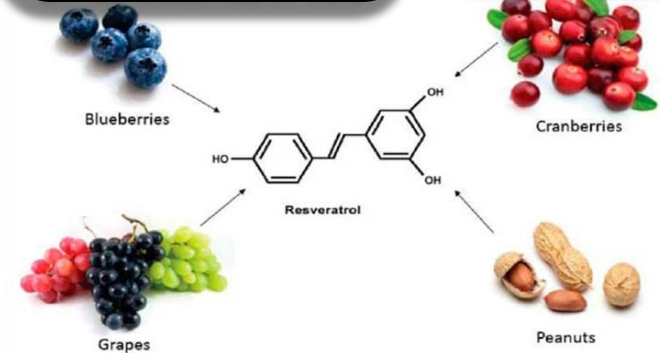
Fuente de ovocitos
Donantes:
vivas /
sacrificadas

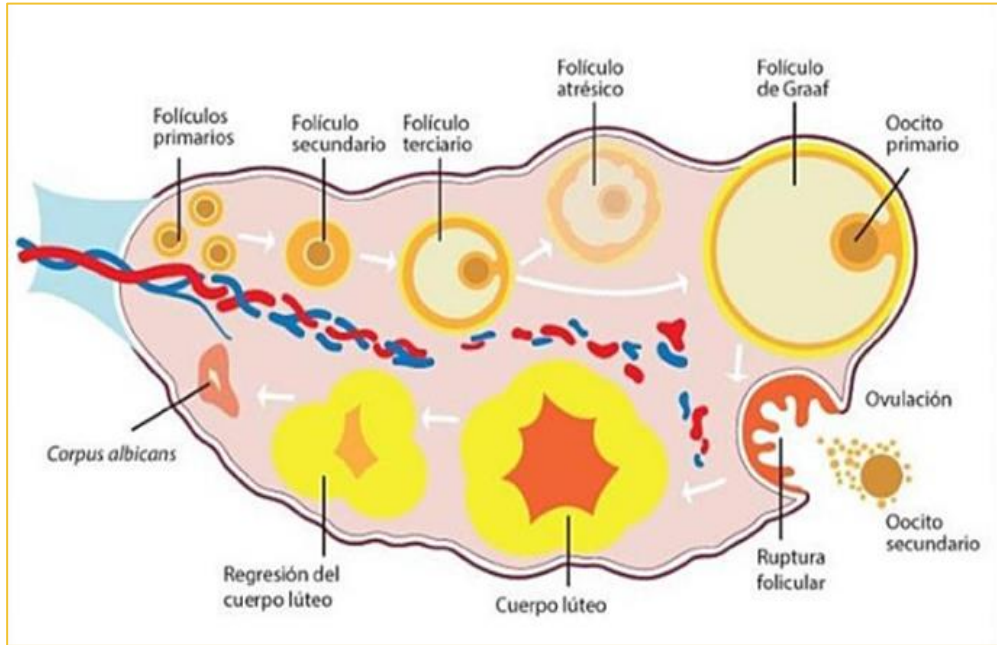


ROS

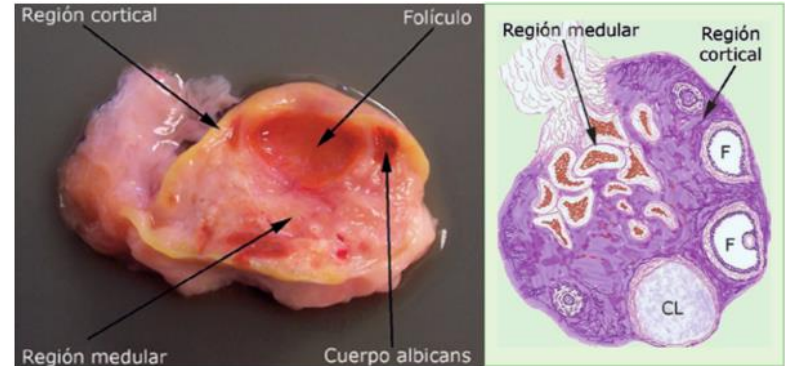
En los sistemas *in vitro*

Ovocitos de calidad





La obtención de COCs, se realiza a partir de los folículos





Objetivos



Objetivo General

- *Estudiar la maduración de oocitos con resveratrol a partir de Folículos de Graff de 0,3-20 mm de diámetro.*

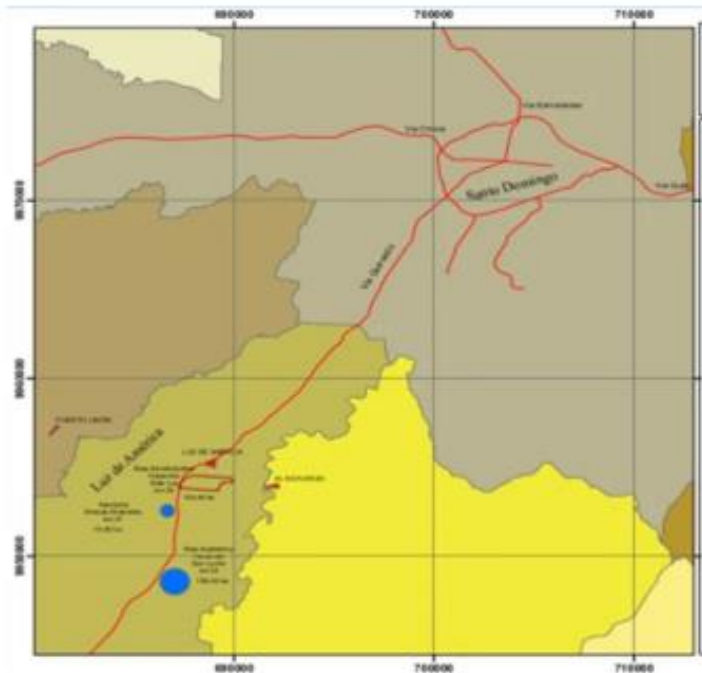
Objetivos Específicos

- Recuperar ovocitos a partir de Folículos de Graff de 0,3 – 20 mm de diámetro.
- Madurar oocitos sin antioxidantes y con incubación en cámara de CO₂ al 6%.
- Madurar oocitos con 100 μ M de resveratrol y con incubación en cámara de CO₂ al 6%.
- Evaluar los oocitos madurados in vitro con resveratrol.





Materiales y Métodos



Ubicación Política

País: Ecuador
Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón: Santo Domingo de los Colorados
Parroquia: Luz de América
Dirección: Vía Quevedo km 24, margen izquierdo

Ubicación Ecológica

Zona de vida: Bosque húmedo tropical
Altitud: 224 msnm
Precipitación: 2860 mm año
Humedad relativa: 85%

Ubicación Geográfica

Latitud: 00° 24´ 36"
Longitud: 79° 18´ 43"
Altitud: 270 msnm





EPMTH

Colecta y transporte de ovarios



Solución de transporte /
Temperatura

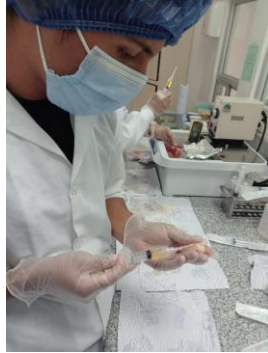


Tiempo



Laboratorio

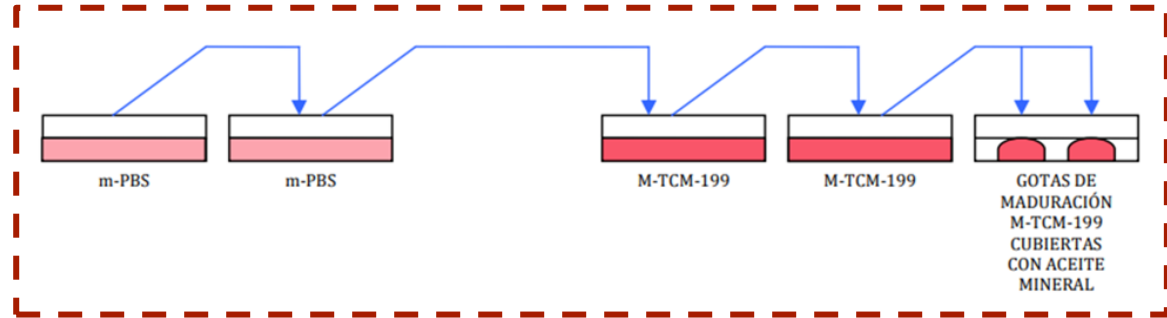
Aspiración de folículos de Graaf



Aspiración folicular

ovocitos en solución
dulbecco enriquecida

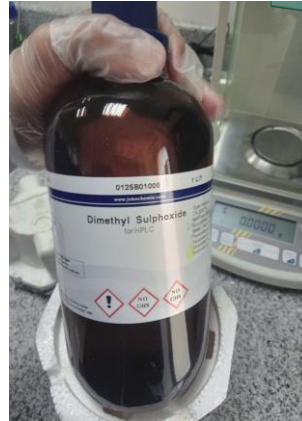
Selección y lavado de
ovocitos



Antioxidantes y medio



Resv.



DMSO

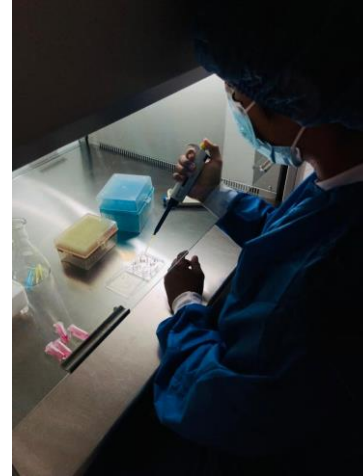
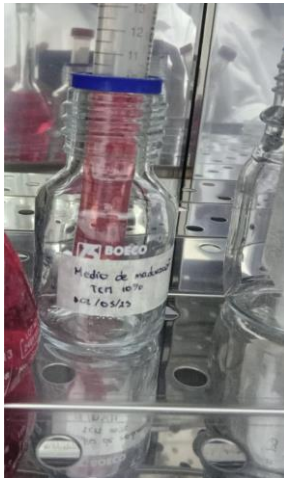


α -tocoferol

Sol. 0.2 M y 0.02 M de resveratrol y Sol. 0.2 M y 0.02 M de α -tocoferol

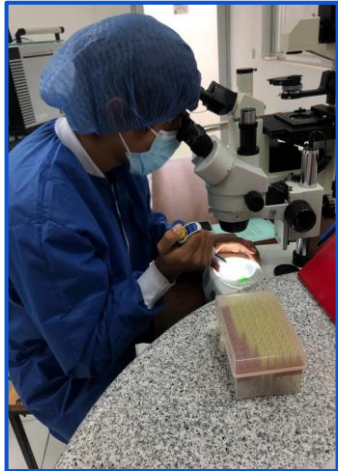


Medio de maduración de ovocitos



Gotas de 100 μ L de medio

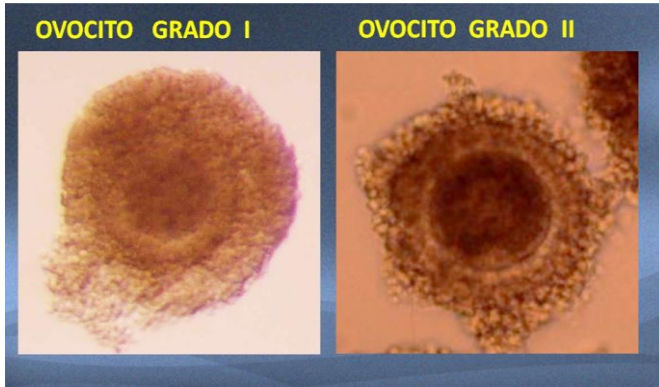
Maduración de ovocitos



Incubación: 38°C, con 90% de Humedad relativa (HR) y 6% CO₂, por 24 horas.

Evaluación de los ovocitos maduros

En base a las células del cúmulus.



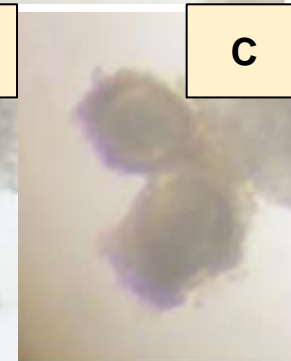
Viables

Categoría 1: Posee un citoplasma finamente granulado, homogéneo y que cubre por completo el área delimitada por la zona pelúcida.

Categoría 2: El citoplasma granulado no se encuentra distribuido de forma uniforme y que cubre por completo el área delimitada por la zona pelúcida.

Categoría 3: el citoplasma se encuentra vacuolado, presenta fragmentaciones y no cubre por completo el área delimitada por la zona pelúcida.

N°R	N° Ovarios	Antioxidante + concentración	Resv. 0 μ M			Resv. 10 μ M			Resv. 100 μ M			α -Toc. 0 μ M			α -Toc. 10 μ M			α -Toc. 100 μ M		
			I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	106	120	3	9	4	7	8	3	4	7	1	3	8	4	4	9	3	6	8	3
2	102	120	2	8	4	6	8	4	3	5	2	3	7	5	4	9	4	5	8	3
3	114	120	3	9	4	7	8	3	3	5	3	2	8	4	3	8	3	4	7	4
4	107	120	3	8	4	7	7	4	4	6	3	3	9	4	3	8	4	5	7	4
Sub Total			11	34	16	27	31	14	14	23	9	11	<u>32</u>	<u>17</u>	14	34	14	20	30	14
Total	429	480	61			72			46			60			62			64		



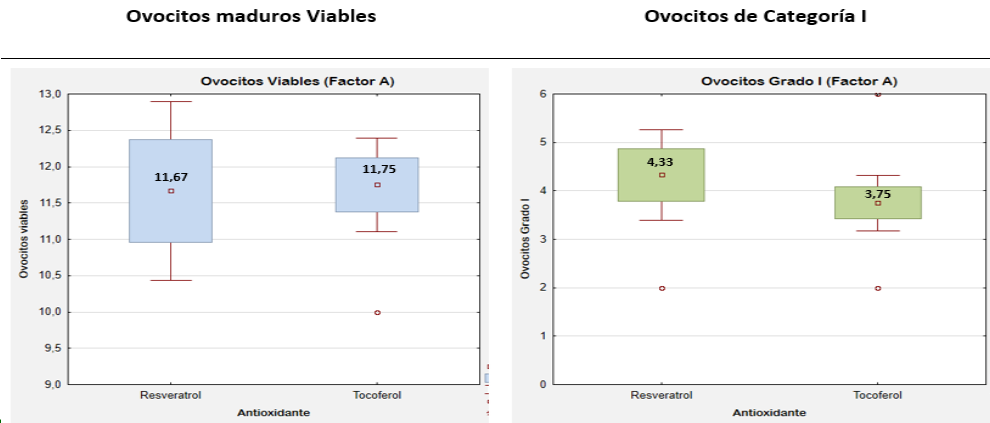
A: ovocitos de grado I; B: ovocito de grado II;
C: ovocito de grado III

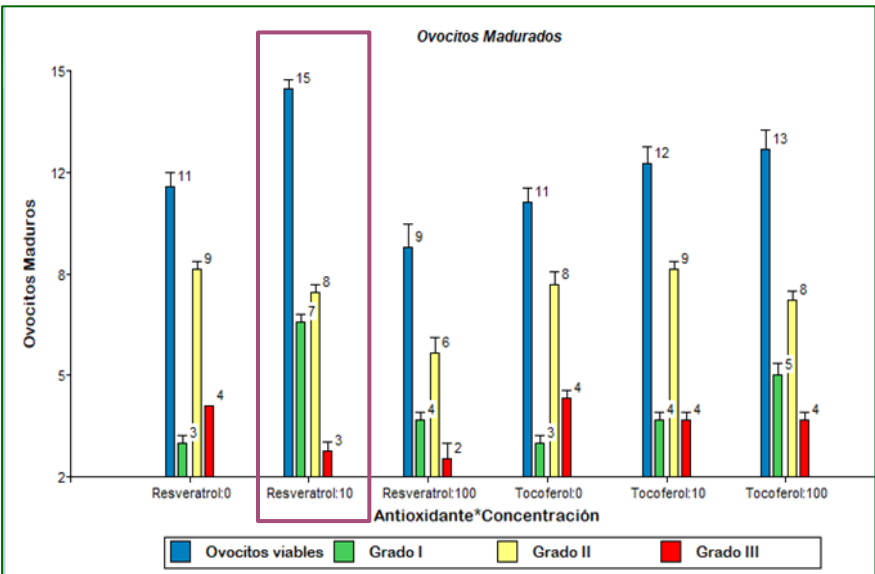
Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Antioxidante (Factor A)

Factor A (Antioxidantes)	Ovocitos madurados viables	Categoría I	Categoría II	Categoría III
Resveratrol	11,67 ^A	4,33 ^A	7,33 ^A	2,92 ^A
α -Tocoferol	11,75 ^A	3,75 ^B	8,00 ^B	3,75 ^B

- Diferencia significativa para el factor A, para ovocitos de categoría I, II y III.
- No hay diferencia en ovocitos viables

- (Pennisi-Forell, 2013), el resveratrol posee una mayor actividad antioxidante que el α -tocoferol, debido a su estructura química (2 anillos fenólicos y más grupos OH^-)





Factor B (Concentración de antioxidantes)	Ovocitos madurados viables	Categoría I	Categoría II	Categoría III
Resveratrol + 0 μM	11,25 ^{AB}	2,75 ^A	8,50 ^B	4,00 ^B
Resveratrol + 10 μM	14,50 ^C	6,75 ^C	7,75 ^B	2,50 ^A
Resveratrol + 100 μM	9,25 ^A	3,50 ^A	5,75 ^A	2,25 ^A
α -tocoferol + 0 μM	10,75 ^{AB}	2,75 ^A	8,00 ^B	4,25 ^B
α -tocoferol + 10 μM	12,00 ^B	3,50 ^A	8,50 ^B	3,50 ^{AB}
α -tocoferol + 100 μM	12,50 ^{BC}	5,00 ^B	7,50 ^B	3,50 ^{AB}

Nota: Considerar el valor de $p < 0,05$

(Torres-Osorio et al., 2019), usando 0.1, 1.0 y 10 μM de resveratrol:

- redujo las ERO
- aumentó la concentración de progesterona y GSH intracelular.

Concentraciones elevadas de Resveratrol (40 μM) pierde el efecto positivo (Torres-Osorio et al., 2019).



Conclusiones



El resveratrol en la MIV demostró ser capaz de contrarrestar los efectos negativos de la formación de ERO, permitiendo mejorar la maduración de los ovocitos bovinos.

La suplementación de la MIV de ovocitos con 10 μM de resveratrol es el mejor método para obtener una mayor cantidad de ovocitos viables (Grado 1 y 2), pero sobre todo, es el mejor método para obtener ovocitos de Grado 1

La técnica de MIV permite aprovechar gran parte de los ovocitos del ovario y en combinación con otras TRA, permite producir y diseminar un gran número de crías provenientes de animales de interés con superioridad genética.





Recomendaciones



Utilizar resveratrol con una concentración de 10 μM o una concentración ligeramente inferior



Estudiar el efecto del Licor Folicular en los procesos de MIV de embriones y su combinación con los antioxidantes.



Se recomienda preparar la solución dulbecco enriquecida el mismo día en el que se realizará la aspiración folicular



Dejar incubar al medio de maduración por un tiempo mayor o igual a dos horas antes de su uso, para que se tempere y acondicione a los parámetros del cultivo, y no cause un estrés térmico sobre los ovocitos.





¡GRACIAS!

