



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

Tandazo Cerón, Deivis Alejandro

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

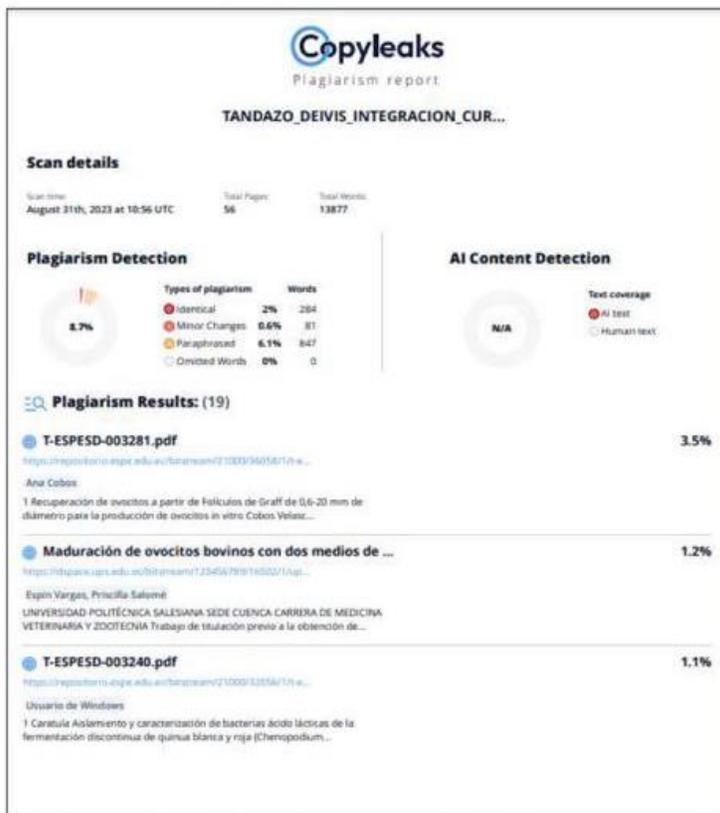
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Carrera Garces, Fredy Patricio PhD.

25 de agosto del 2023

## Reporte de verificación del contenido



FREDDY PATRICIO  
CARRERA GARCES

Dr. Carrera Garces Freddy Patricio PhD.

C.C. 060203156-9

Director del Proyecto de Integración Curricular



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Estudio de la maduración de oocitos con resveratrol a partir de folículos de Graff de 0,3-20 mm de diámetro”** fue realizado por el señor **Tandazo Cerón Deivis Alejandro**, 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 de los Tsáchilas, 25 de agosto del 2023



---

**Dr. Carrera Garces Fredy Patricio PhD.**

C.C. 060203156-9

**Director del Proyecto de Integración Curricular**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Tandazo Cerón Deivis Alejandro**, con cédula de ciudadanía N° 230056215-0, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de Integración Curricular: **“Estudio de la maduración de oocitos con resveratrol a partir de folículos de Graff de 0,3-20 mm de diámetro”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto del 2023**

Firma:

---

**Tandazo Cerón Deivis Alejandro.**

C.C.: 230056215-0



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de publicación**

Yo, **Tandazo Cerón Deivis Alejandro**, con cédula de ciudadanía N° 230056215-0, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Estudio de la maduración de oocitos con resveratrol a partir de folículos de Graff de 0,3-20 mm de diámetro”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto del 2023**

Firma:

---

**Tandazo Cerón Deivis Alejandro.**

C.C: 230056215-0

### **Dedicatoria**

Este trabajo de Investigación curricular va dedicado a mi madre Flor María Cerón Navarro y a mi padre Melitón Octavio Tandazo Grijalva, unos guerreros que nunca se han dado por vencidos, quienes me han permitido cumplir esta pequeña gran meta, a mis hermanos Gabriel Steeven y Brayan Jesús, por su apoyo incondicional y por siempre haber estado al pendiente de mi en el transcurso de mis estudios. A mis docentes Gisella Mantilla, Mayra Ronquillo y Freddy Carrera, quienes me inspiraron y me enseñaron a jamás rendirme, a no darme por vencido y superar toda adversidad.

## **Agradecimiento**

En primer lugar, a Dios, quien me ha dado la salud y vida y me ha ayudado a resolver cada obstáculo que se ha presentado en mi vida. A mis padres, hermanos, docentes, conocidos y a todos mis amigos. La vida y las personas me han sabido tratar muy bien, es por ello que les agradezco a todos, ya que cosas tan sencillas como un saludo con buena energía, una grata conversación, un abrazo, una clase juntos o un trabajo en grupo me han llevado hasta donde me encuentro actualmente. Gracias a todos.

También quiero agradecerle a mi enamorada Adriana y a su familia, quienes me han apoyado durante los últimos años. Le agradezco a mi Escuela, Colegio y Universidad, y a todos sus docentes, quienes me han brindado sus conocimientos y me han formado.

A todos mis amigos, pero sobre todo a Adriana Cajamarca, Andrés Moyano, Kassandra Heredia, Diana Macías, Diana Hermoza, Susana Anchico, Fabian Cedeño, Alejandra Tuarez, Blanca Palma, Gema Villaprado, Brandon Viteri, Angie Iguasnia, Elyan Suarez, Rosa Angélica, Erika Galván, Diana Rosero y Genecys Ramírez, ya que todos ellos siempre me han brindado su apoyo incondicional y me han apoyado en todo momento.

## Índice de contenido

Caratula.....	1
Reporte de verificación del contenido.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de contenido .....	8
Índice de Figuras .....	12
Índice de tablas .....	13
Resumen .....	14
Abstract.....	15
Capítulo I.....	16
Introducción.....	16
Planteamiento del problema .....	18
Justificación.....	19
Objetivos .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos .....	20

Capítulo II .....	21
Marco teórico.....	21
Aparato reproductor de la hembra y su funcionamiento.....	21
Anatomía y fisiología del oviducto.....	23
Anatomía y fisiología de los ovarios.....	25
Cuerpo lúteo .....	27
Folículos Ováricos .....	29
Ciclo Estral.....	31
Ovocito bovino.....	32
Recolección de ovarios de matadero.....	33
Obtención de ovocitos.....	33
Aspiración folicular con jeringa.....	34
Selección y clasificación de los ovocitos .....	34
La selección según la morfología del ovocito. ....	35
Clasificación de los ovocitos.....	35
Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos .....	37
Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos (MIV).....	37
Medio para la MIV de ovocitos.....	39
Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) .....	40
Uso de antioxidantes en el medio de maduración .....	41

	10
Resveratrol.....	41
$\alpha$ -tocoferol.....	42
Capítulo III.....	44
Materiales y métodos.....	44
Ubicación del área de investigación.....	44
Ubicación política.....	44
Ubicación ecológica.....	44
Ubicación geográfica.....	45
Materiales.....	46
Transporte de ovarios.....	46
Aspiración de ovocitos.....	47
Maduración de ovocitos.....	48
Métodos.....	49
Solución de transporte y lavado de ovarios.....	49
Solución Dulbecco Normal.....	49
Solución Dulbecco Enriquecida (Medio de lavado y aspiración de ovocitos).....	49
Solución de Antioxidantes.....	50
Medio de maduración TCM 199 1X.....	50
Medio de maduración TCM 199 1X con antioxidantes.....	51
Colecta, transporte y lavado de los ovarios.....	51

	11
Recuperación de los complejos Cumulus-Ovocitos (COCs) .....	51
Maduración de ovocitos .....	52
Evaluación de la maduración .....	53
Diseño experimental .....	53
Factores de experimento .....	53
Tratamientos que comparar .....	54
Tipo de diseño .....	54
Repeticiones .....	54
Análisis funcional .....	54
Capítulo IV .....	55
Resultados .....	55
Categorización de los ovocitos .....	56
Análisis de varianza .....	57
Discusión .....	66
Capítulo V Conclusiones .....	73
Capítulo VI .....	74
Recomendaciones .....	74
Capítulo VII .....	75
Bibliografía .....	75

## Índice de Figuras

Figura 1 <i>Esquema del aparato reproductor de la vaca</i> .....	21
Figura 2 <i>Órganos del aparato reproductor de la vaca</i> .....	22
Figura 3 <i>Esquema del oviducto</i> .....	24
Figura 4 <i>Oviducto</i> .....	25
Figura 5 <i>Ovario conectado al cuello uterino por medio del oviducto</i> .....	26
Figura 6 <i>Ovario bovino</i> .....	27
Figura 7 <i>Cuerpo Lúteo</i> .....	28
Figura 8 <i>Folículos y cuerpos lúteos</i> .....	31
Figura 9 <i>Diagrama del ciclo estral de la hembra</i> .....	32
Figura 10 <i>Categorías de ovocitos bovinos</i> .....	36
Figura 11 <i>Ovocitos bovinos maduros</i> .....	38
Figura 12 <i>Estructura de <math>\alpha</math>-tocoferol</i> .....	42
<b>Figura 13</b> <i>Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación</i> .....	45
Figura 14 <i>Esquema del correcto lavado y maduración de los ovocitos bovinos</i> .....	52
Figura 15 <i>Ovocitos madurados después de 24 horas</i> .....	56
Figura 16. <i>Clasificación de ovocitos madurados</i> .....	56
Figura 17 <i>Resumen de la cantidad de ovocitos madurados</i> .....	57
Figura 18 <i>Estudio del efecto de los tipos de antioxidantes (Factor A) en las variables de estudio</i> .....	62
Figura 19 <i>Estudio del efecto de las concentraciones de antioxidantes (Factor B) en las variables de estudio</i> .....	64

**Índice de tablas**

Tabla 1 <i>Equipos, insumos, reactivos y muestras para el transporte de ovarios</i> .....	46
Tabla 2 <i>Equipos, insumos, reactivos y muestras para la aspiración de ovocitos</i> .....	47
Tabla 3 <i>Equipos, insumos, reactivos y muestras para la maduración de ovocitos</i> .....	48
Tabla 4 Factores y niveles a probar en el trabajo de experimentación .....	53
Tabla 5 <i>Tratamientos que comparar en el trabajo de experimentación</i> .....	54
Tabla 6 <i>Registro de ovarios y ovocitos utilizados en cada tratamiento</i> .....	55
Tabla 7 <i>Análisis de varianza de la maduración de ovocitos viables</i> .....	57
Tabla 8 <i>Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría I</i> .....	58
Tabla 9 <i>Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría II</i> .....	59
Tabla 10 <i>Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría III</i> .....	60
Tabla 11 <i>Prueba de significancia de Tukey para el Factor A (Antioxidantes)</i> .....	61
Tabla 12 <i>Prueba de Tukey para el Factor B (Concentración de antioxidante)</i> .....	63
Tabla 13 <i>Prueba de Tukey para la interacción AxB (Antioxidante x Concentración de antioxidante)</i> .....	65

## Resumen

Actualmente las tecnologías de reproducción asistida (TRA) son esenciales en la industria ganadera, ya que han permitido mejorar la calidad del ganado y aumentar su producción. Dentro de estas herramientas biotecnológicas se encuentra la Producción *in vitro* (PIV) de embriones, cuya base, al igual que en otras TRA, es la Maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos, por lo que, tener una fuente de ovocitos de buena calidad resulta crucial para el éxito o fracaso de estas técnicas. La formación de Especies reactivas de oxígeno (ERO) y los diferentes tipos de estrés, consecuencia del cultivo *in vitro* (CIV) como tal, son los responsables de la pérdida de la calidad, lo cual afecta el proceso de fertilización y la tasa de embriones obtenidos al final del proceso. Actualmente se ha demostrado los antioxidantes ayudan a contrarrestar estos efectos negativos, debido a esto, en el presente estudio, se realizó la MIV de ovocitos bovinos recuperados de matadero suplementando el medio de maduración con 0, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol y  $\alpha$ -tocoferol, dando como resultado una mejora significativa en la calidad de los ovocitos madurados con 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol (72.5%), frente al 56.25 %, 46.25 %, 53.75 %, 60.00 %, y 62.5 %, de las suplementaciones con 0 y 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol y con 0, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol respectivamente. La superioridad de la calidad de los ovocitos madurados con el resveratrol frente al  $\alpha$ -tocoferol, muy probablemente se deba a que este es un antioxidante más poderoso debido a su estructura química, la cual cuenta con dos anillos fenólicos y una mayor cantidad de grupos -OH. Esto también podría explicar el motivo por el cual, la suplementación con 100  $\mu\text{M}$  deja de ser favorable. Por lo que se concluye que la suplementación del medio de maduración con resveratrol permite mejorar la calidad de los ovocitos madurados y se recomienda continuar estudiando más concentraciones de este antioxidante y evaluar su efecto en la Fertilización *in vitro* (FIV) y posterior PIV de embriones, para aprovechar al máximo los beneficios que este antioxidante podrían aportar.

*Palabras clave: Aspiración folicular, ovocitos, maduración, resveratrol,  $\alpha$ -tocoferol.*

### Abstract

Currently, assisted reproductive technologies (ART) are essential in the livestock industry, since they have allowed improving the quality of livestock and increasing their production. Within these biotechnological tools is the *In Vitro* Production (IVP) of embryos, whose base, as in other ART, is the *In Vitro* Maturation (IVM) of the oocytes, therefore, having a source of good quality oocytes Quality is crucial to the success or failure of these techniques. The formation of Reactive Oxygen Species (ROS) and the different types of stress, a consequence of in vitro culture as such, are responsible for the loss of quality, which affects the fertilization process and the rate of embryos obtained at the end. of process. Currently, antioxidants have been shown to help counteract these negative effects, due to this, in the present study, IVM of bovine oocytes recovered from the slaughterhouse was performed by supplementing the maturation medium with 0, 10 and 100  $\mu\text{M}$  of resveratrol and  $\alpha$ -tocopherol. , resulting in a significant improvement in the quality of oocytes matured with 10  $\mu\text{M}$  resveratrol (72.5%), compared to 56.25 %, 46.25 %, 53.75 %, 60.00 %, and 62.5 %, of supplementation with 0 and 100  $\mu\text{M}$  of resveratrol and with 0, 10 and 100  $\mu\text{M}$  of  $\alpha$ -tocopherol respectively. The superiority of the quality of oocytes matured with resveratrol compared to  $\alpha$ -tocopherol is most likely due to the fact that this is a more powerful antioxidant due to its chemical structure, which has two phenolic rings and a greater number of groups - OH. This could also explain why supplementation with 100  $\mu\text{M}$  is no longer favourable. Therefore, it is concluded that supplementation of the maturation medium with resveratrol can improve the quality of matured oocytes and it is recommended to continue studying more concentrations of this antioxidant and evaluate its effect on in vitro fertilization (IVF) and subsequent PIV of embryos. to take full advantage of the benefits that this antioxidant could bring.

*Keywords: Follicular aspiration, oocytes, maturation, resveratrol,  $\alpha$ -tocopherol.*

## Capítulo I

### Introducción

Las TRA se encuentran bien establecidas en la industria ganadera brindando valiosas herramientas como la Inseminación artificial (IA), la Transferencia de embriones (TE), la PIV de embriones, la criopreservación, la Transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), entre otras (Urrego, Rodríguez & Niemann, 2014). Esto ha permitido resolver problemas de reproducción y disminuir el espacio generacional, para propagar rápidamente material genético de alta calidad tomado de animales destinados a la reproducción (Ciani et al., 2021).

La PIV de embriones combinada con el uso de Semen sexado (SS) y la Selección genómica (SG) actualmente están siendo aplicadas en Europa, Norteamérica y Sudamérica, debido a que presenta ventajas como una mayor tasa de preñez por unidad de tiempo, aumento de donantes femeninas y la mayor posibilidad de obtener crías con el sexo deseado (Ferré et al., 2020). La PIV consta de tres etapas principales: la primera etapa inicia con la MIV de los ovocitos, como segunda etapa se tiene la FIV de los ovocitos MIV mediante coincubación con espermatozoides capacitados y la tercera etapa consiste en el CIV de los cigotos hasta la obtención de blastocistos, momento en el cual se encuentran aptos para ser transferidos a una hembra receptora (Soto-Heras y Paramio, 2020).

Los ovocitos inmaduros se pueden obtener tanto de animales vivos mediante una aspiración guiada por ultrasonido, como de animales *post mortem* (de matadero, destinados a la producción de carne) mediante la extirpación de los ovarios. En ambos, la extracción de ovocitos se realiza mediante la aspiración de los folículos antrales, de entre 2 a 8 mm de tamaño, en los cuales, por lo general, se puede obtener entre 4 a 5 ovocitos de grado 1 y 2 (aptos para la maduración) por animal (Ferré et al., 2020).

En bovinos, cerca del 30% de los ovocitos madurados de forma *in vitro* logran convertirse en embriones que llegan al estadio de blastocisto (Urrego et al., 2014). Por lo tanto, aunque la PIV de embriones bovinos actualmente funciona muy bien, aún se debe mejorar. De todos los ovocitos aspirados, alrededor del 90% llegan con éxito a la etapa de Metafase II, de los cuales, cerca del 80% son fertilizados *in vitro*, y de estos, cerca del 50% se vuelven blastocistos (Ciani et al., 2021).

Aunque la mayor parte de las TRA busquen crear un entorno *in vitro* semejante al natural, siempre se da el aumento progresivo de catabolitos, por lo cual aparecen sustancias dañinas para las células gaméticas o sus productos, como en el caso de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Por lo que resulta importante el uso de antioxidantes, los cuales podrían proteger a las células de las ERO (Ciani et al., 2021). El resveratrol (Resv; 3,4,5-trihidroxi-trans-estilbeno), es un antioxidante que se encuentra en la naturaleza como un compuesto polifenólico contenido en algunas plantas y en el vino tinto (Sprícigo et al., 2017). En los últimos años diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han reportado varias propiedades biológicas importantes entre las que se destacan efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos y antiproliferativos, y recientemente se demostró que el resveratrol mejora el número y la calidad de los ovocitos (Liu et al., 2018).

A pesar de que la aplicación de diversos antioxidantes, incluyendo al resveratrol, ha ido en aumento en los últimos años, no se tiene mucha información respecto a las concentraciones más idóneas y las etapas más adecuadas para su aplicación tanto solo como combinado con otros antioxidantes (Madrid-Gaviria et al., 2019). Por tanto, es necesario estandarizar un protocolo de MIV que permita obtener ovocitos maduros de buena calidad, puesto que estos servirán posteriormente como base para la producción de embriones. Por tal razón el presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antioxidante del resveratrol en la MIV de oocitos bovinos recuperados a partir de folículos de Graff de 0.3 - 20 mm de diámetro.

## Planteamiento del problema

Durante los últimos 100 años se han tenido grandes avances en las TRA, las cuales iniciaron con la inseminación artificial, la superovulación y la criopreservación de esperma con glicerol, y que actualmente permiten realizar MIV de ovocitos, PIV de embriones, clonación, transferencia de embriones, análisis genómico, edición genética, entre otras técnicas (Moore y Hasler, 2017). Pese a los grandes avances en biotécnicas *in vitro* logrados en las últimas décadas, aún se tienen varios obstáculos por resolver, como en el caso de la maduración, fertilización o cualquier otro proceso *in vitro*, en donde se genera estrés por calor y oxidativo, afectando el desarrollo de los ovocitos y de los embriones (Melo-Sterza y Poehland, 2021).

Una de las mayores barreras a superar para el aprovechamiento y para el desarrollo de nuevas técnicas reproductivas es la falta de ovocitos con buena fertilidad, para la PIV de embriones de calidad (Telfer et al., 2000). La limitada calidad de ovocitos obtenidos mediante MIV afecta todo el proceso de PIV de embriones y se traduce a bajos niveles de preñez, por lo que actualmente se busca resolver estas deficiencias (Ferré et al., 2020). Para aumentar el éxito de las TRA se debe disponer de ovocitos maduros de buena calidad, que permitan obtener un alto grado de FIV (Telfer et al., 2019). Una baja calidad de ovocitos limita el éxito de técnicas como la clonación animal (An et al., 2019).

Muchos protocolos usan antioxidantes como el resveratrol, con la finalidad de mejorar la MIV de los ovocitos y la PIV de embriones, mediante la eliminación de ERO o promoviendo la síntesis de GSH. A pesar de que se ha probado una amplia variedad de antioxidantes en procesos *in vitro* se tienen pocos estudios que evalúen la eficacia de los antioxidantes en búfalos y bovinos (Currin et al., 2021). Por ello, resulta imprescindible evaluar y estandarizar un método eficiente mediante la aplicación de resveratrol en la MIV para obtener ovocitos maduros de buena calidad.

## Justificación

La reproducción asistida en animales permite la obtención de más crías de la hembra en menos tiempo de las que se podría obtener de forma natural a lo largo de toda su vida. El desarrollo de técnicas de FIV incluso ha permitido la criopreservación y fácil transporte de los embriones, lo que facilita que estos se puedan enviar a lugares lejanos, incluso de un país a otro (Moore y Hasler, 2017).

La MIV de ovocitos bovinos es la base para la PIV de embriones y para otras TRA, en donde, una maduración molecular, nuclear y citoplasmática adecuada es imprescindible para el futuro desarrollo embrionario, sin embargo, no todos los ovocitos obtenidos en la MIV se convierten en embriones viables debido a la formación de ERO. Actualmente existen métodos en los que se ha implementado una amplia gama de antioxidantes (Cajas et al., 2020). Uno de los antioxidantes que recientemente se ha implementado en la MIV es el resveratrol, el cual puede ayudar a contrarrestar los efectos causados por el estrés oxidativo en los ovocitos, mejorando la calidad de los ovocitos (Piras et al., 2020). Esto se debe principalmente a que elimina las ERO y aumenta el contenido de glutatión (GSH) de los ovocitos (Itami et al., 2015).

En los últimos años la demanda de embriones bovinos ha ido en aumento gracias a la implementación de las TRA por todo el mundo, para esto, se requiere de una gran cantidad de ovocitos maduros de buena calidad, por lo tanto, se podría utilizar el resveratrol en la MIV de ovocitos, para tener una fuente confiable de ovocitos maduros de buena calidad que permita satisfacer esta creciente demanda (Nagano, 2019).

## 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 CO<sub>2</sub> al 6%.

Madurar oocitos con 100 μM de resveratrol y con incubación en cámara de CO<sub>2</sub> al 6%.

Evaluar los oocitos maduros *in vitro* con resveratrol.

## Capítulo II

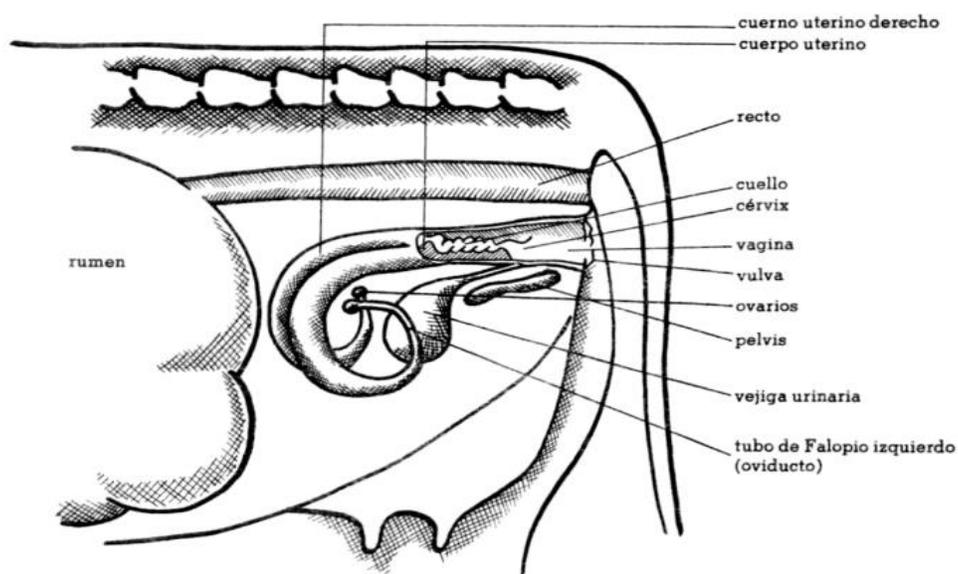
### Marco teórico

#### Aparato reproductor de la hembra y su funcionamiento

El aparato reproductor de una vaca, al igual que en muchas hembras de otras especies domésticas está constituido por los ovarios (gónadas sexuales) y un sistema de órganos tubulares, constituido por el oviducto, el útero y la vagina, y en la parte más externa, el vestíbulo vaginal y la vulva, como se muestra en la figura 1 (Leyva et al., 1999).

#### Figura 1

*Esquema del aparato reproductor de la vaca*



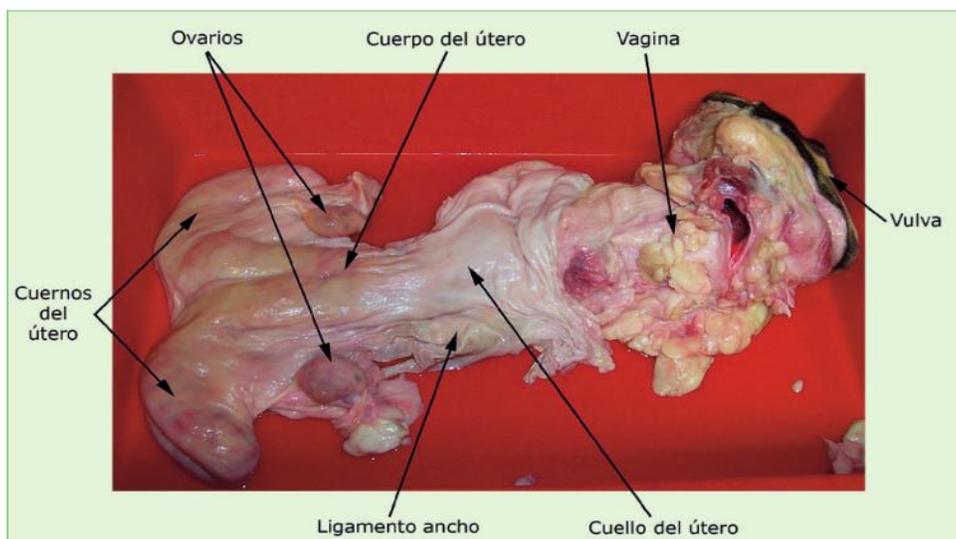
Nota: Anatomía del aparato reproductor femenino conformado por: los ovarios, el oviducto, el útero, el cérvix, el canal del cérvix, la vagina y la vulva. Tomada de (Castro, 1984, p. 143).

Todas las estructuras importantes que conforman el aparato reproductor de la hembra bovina se logran apreciar detalladamente en la figura 2, el cual posee dos ovarios, que tienen la tarea de

producir los óvulos y las hormonas estrógeno y progesterona, las cuales trabajan en sincronía y juegan un papel importante en el mantenimiento y regulación de la función y ciclo reproductivo hembra. El oviducto es el encargado de recibir al óvulo (célula sexual de la hembra) después de que ha transcurrido la ovulación y de transportar al espermatozoide (célula sexual del macho) hasta donde se encuentra el óvulo para que entren en contacto y ocurra el proceso de fertilización. Transcurrido el proceso de fecundación, el oviducto se encarga de transportar al óvulo fecundado hasta el útero. El útero cumple con varias funciones importantes como: transportar los espermatozoides hasta el oviducto (utilizando contracciones musculares); facilitar la implantación del óvulo fertilizado; asegurarse de que el embrión no muera y tenga un óptimo desarrollo por medio de secreciones uterinas antes de la implantación que mejoran su nutrición; instaurar un transporte de nutrientes al feto por medio de la placenta; y expulsar la placenta y feto durante el proceso del parto (Castro, 1984, p. 143).

## Figura 2

### *Órganos del aparato reproductor de la vaca*



Nota: Fotografía del aparato reproductor de la hembra con todos los órganos genitales que lo conforman. Tomada de (Luis Quintela, 2007, p. 23).

La siguiente estructura importante del aparato reproductor de la hembra es el cérvix o cuello del útero, la parte inferior y estrecha del útero que se conecta con la vagina, formando una barrera protectora para el útero que impide el ingreso de cuerpos extraños, capaces de provocar daños o infecciones en el útero, que puedan desencadenar en un aborto en caso de existir preñez. El canal del cérvix se encuentra ligeramente obstruido por cuatro anillos y está tapado por el moco cervical, el cual normalmente es gelatinoso, pero se vuelve líquido durante el celo, permitiendo la cópula con el macho. Como siguiente estructura tenemos a la vagina, localizada entre el cuello uterino y la vulva, y cumple con varias funciones importantes como: la captación del semen durante la monta natural o en procesos de IA, y después de recibir al semen, permitirá que este inicie su trayectoria hacia el cuello uterino y posteriormente finalmente al útero; se encarga de la lubricación debido a la excitación durante el apareamiento, lo cual ayuda a la penetración del pene; permite la expulsión de fluidos hacia el exterior; y funciona como canal de parto por el cual pasará el feto al momento de nacer. Finalmente, en el aparato reproductor culmina con la vulva, una abertura externa visible seguida de la piel de la hembra, la cual juega un papel importante en la reproducción y el parto. La vulva está conformada por: los labios mayores y menores, los cuales rodean la abertura vaginal, protegiendo el tracto reproductivo; el clítoris, una estructura pequeña, con alta sensibilidad, que se encuentra cerca de la abertura vaginal, y juega un papel fundamental en la estimulación sexual de la hembra; el orificio vaginal, donde el macho deposita el semen durante la monta; y el orificio uretral, una estructura cercana al orificio vaginal, por donde la hembra secreta la orina (Castro, 1984, p. 144).

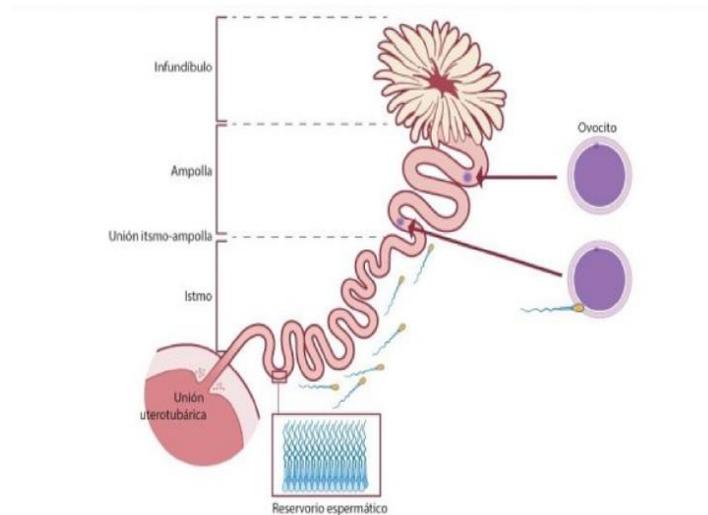
### ***Anatomía y fisiología del oviducto***

También conocido tuba oviductal o trompas de Falopio, está conformado por dos estructuras sinuosas que recogen y transportan hacia los cuernos uterinos a los ovocitos que salen de los folículos

de cada ovario, y es en estos donde se da la fecundación por medio del espermatozoide, para formar el embrión, como se muestra en la figura 3 (Urroz, 1991, p. 206).

### Figura 3

#### *Esquema del oviducto*



Nota: Transporte y fecundación del ovocito por medio de los espermatozoides, en el oviducto. Tomado de (Ungerfeld, 2020, p. 186).

El oviducto está conformado por tres secciones en base a sus funciones, como se logra apreciar en la figura 4. Primeramente, tenemos al infundíbulo, una estructura en forma de embudo, ubicada al extremo del oviducto, conectando con el espacio peritoneal en las cercanías del ovario. Esta estructura se encuentra libre, a excepción de una pequeña zona fijada en un extremo del ovario, mediante el cual lo mantiene fijado. La parte superficial interna del infundíbulo está constituida por una capa de numerosas estructuras en forma de dedos, brindando una capa suave denominada Fimbria, la cual se extiende sobre la superficie ovárica durante la etapa periovulatoria, para ayudar a capturar el óvulo recientemente liberado y dirigirlo hacia la ampolla del oviducto, a través del ostium (aberturas en los extremos del oviducto). El oviducto bovino cuenta con dos ostiums, uno cerca del ovario por donde el

ovocito es guiado e ingresado al oviducto, y otro en el extremo cercano al útero, permitiendo una comunicación entre los ovarios y el oviducto, y entre el oviducto y el útero. La ampolla, es una zona oviductal que abarca cerca del 50% del oviducto y está conectada por un extremo al infundíbulo y por el otro al istmo, y este último se encuentra conectado al útero, conformando la unión útero-tubárica. Esta unión contiene mucosa y permite regular el paso de fluidos oviductales y de espermatozoides (Luis Quintela, 2007, p. 24).

#### Figura 4

##### *Oviducto*



Nota: Las tres secciones que conforman al oviducto: Infundíbulo, Ampolla e Istmo (forma la unión útero-tubárica). Tomada de (Luis Quintela, 2007, p. 25)

#### ***Anatomía y fisiología de los ovarios***

La hembra cuenta con dos ovarios, los cuales son aplanados, con forma redondeada y una consistencia estable y se encuentran en la cavidad abdominal, conectados al útero por medio de los oviductos, como se muestra en la figura 5. Suelen ser nodulares o tuberculados, debido a la aparición de los folículos, los cuales suelen sobresalir del ovario. Son de menor tamaño que los testículos del macho,

sin embargo, no cuentan con una proporción de tamaño fija con el tamaño corporal. Los ovarios de las hembras sexualmente maduras tienen una forma, tamaño y peso que pueden ser distintos dependiendo de la etapa del ciclo estral en la que se encuentren (Ungerfeld, 2020, p. 4).

### Figura 5

*Ovario conectado al cuello uterino por medio del oviducto*



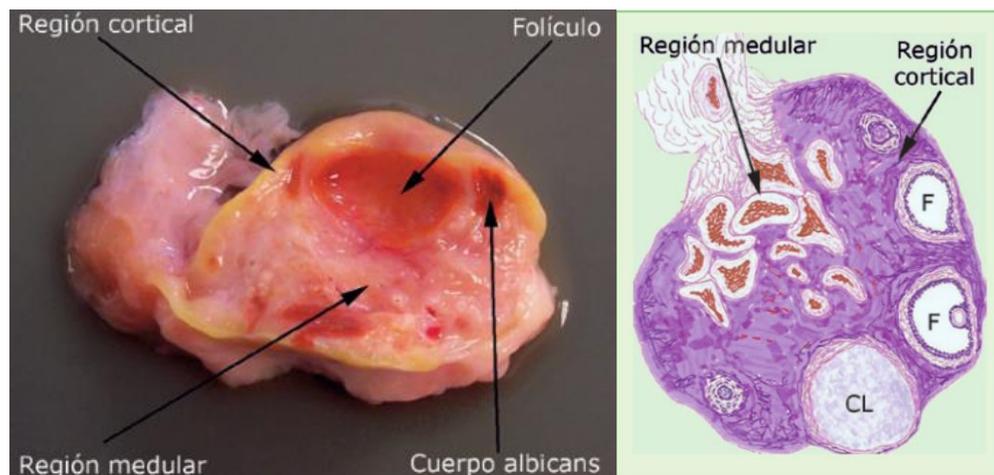
Nota: Se muestra el ovario bovino y las estructuras que lo conectan con el útero: 1. Ovario; 2. Ligamento propio del ovario; 3. Ampolla de la tuba uterina; 4. Istmo de la tuba uterina; 5. Cuerno del útero; y 6. Mesosalpinx. Tomado de (Ungerfeld, 2020, p. 4).

Por lo general, los ovarios de la vaca tienen una longitud y ancho de 2 y 3 cm respectivamente, y tienen un peso aproximado de entre 10 a 15 g. Estos órganos dan lugar a los ovocitos y se encargan de segregar hormonas. Los ovarios están cubiertos por una capa fibrosa denominada túnica albugínea la cual porta en su superficie una serie de cicatrices, los cuerpos lúteos y los folículos de varios tamaños. Cuando ocurre una fecundación, el cuerpo lúteo rápidamente empieza a crecer y desarrollarse y se queda así durante todo el proceso de gestación y culminando el parto, este sufre un proceso de involución, dejando en su lugar una cicatriz (Gloobe, 1989, p. 118).

En la figura 6, se logra observar un ovario de buena calidad con su característica forma redondeada y firme. En la estructura ovárica, se encuentra en primer lugar la médula ovárica, que se encuentra en el centro del ovario. Esta zona está formada por tejido conectivo y una red de arterias, venas, vasos linfáticos y fibras nerviosas. Otra parte del ovario es la corteza o región oviductal. Aquí se encuentran los óvulos en diversos estados de desarrollo, como primario, secundario, antral, atresia, etc., y el cuerpo lúteo en diversos estados de desarrollo y maduración. El estroma ovárico está compuesto por una matriz fibrosa conectiva que contiene fibroblastos y fibrocitos, y forma las tecas ováricas al distribuirse alrededor de los folículos (Luis Quintela, 2007).

### Figura 6

#### *Ovario bovino*



Nota: Corte longitudinal y corte histológico de un ovario bovino, en el cual se pueden observar las distintas estructuras que lo conforman. Tomado de (Luis Quintela, 2007, p. 24)

#### ***Cuerpo lúteo***

El cuerpo lúteo, también denominado cuerpo amarillo, es una estructura que se forma en el ovario después de la ovulación, este se origina de las células de la granulosa que se ubican en la parte

interna del folículo ovárico. Luego de 3 a 4 días de haber finalizado la ovulación, el espacio que era ocupado anteriormente por el folículo se llena de células tecales de pequeño y gran tamaño, que se transforman en células luteales, lo que marca el inicio de la formación del cuerpo lúteo.

En los siguientes días, el cuerpo lúteo incrementa su tamaño y empieza a sobresalir de la superficie del ovario. Su crecimiento es bastante rápido y del séptimo al dieciseisavo día, este logra desarrollarse por completo. En el transcurso de la fase lútea del ciclo reproductivo, el cuerpo lúteo genera progesterona, hormona necesaria para alistar al útero para la implantación del embrión. No obstante, de no ocurrir la fertilización y preñez, el cuerpo lúteo pasa a degenerarse, reduciendo su actividad hormonal y cambiando forma a una estructura pequeña, la cual es conocida como cuerpo lúteo albicans, el cual pasa a un estado inactivo y debido a la reducción de la vascularización puede tomarse de un color blanquecino, como se logra apreciar en la figura 7 (Luis Alaba, 2020, p. 103).

### **Figura 7**

#### ***Cuerpo Lúteo***



Nota: Folículos, Cuerpo lúteo diestro y cuerpos albicans contenidos en el ovario bovino. Tomado de (Denicol, 2013).

### ***Folículos Ováricos***

Los folículos son estructuras básicas de los ovarios, extremadamente importantes para la reproducción, ya que cumplen con la función de dirigir procesos reproductivos y las fases del ciclo estral, además, estos se encargan de la secreción de hormonas y de ovocitos para la fecundación, se encuentran en la zona más externa del ovario bovino, en donde se pueden observar en varios estadios de desarrollo. Los folículos son cavidades ováricas que contienen ovocitos en diferentes fases de formación, en donde cada uno de estos puede llegar a ser liberado durante el proceso de ovulación, y según (Filipiak et al., 2016), estos se pueden clasificar en varios tipos de folículos:

Primeramente, se encuentran los folículos primordiales, los cuales almacenan ovocitos inmaduros envueltos en células planas, estos folículos son los más inmaduros y de menor tamaño. Son identificados histológicamente en base a como está constituido el ovocito, el cual se encuentra en la profase I de la meiosis, específicamente en la fase de diploteno (Filipiak et al., 2016). En esta etapa el ovocito no presenta una zona pelúcida y se encuentra en el centro de células epiteliales granulosa planas, en donde no aumenta de tamaño (Rodgers y Irving, 2010). Además, estos folículos presentan un diámetro aproximado de 40  $\mu\text{m}$  y el ovocito un diámetro aproximadamente de 30  $\mu\text{m}$  (Filipiak et al., 2016). Luego se encuentran los folículos primarios, en donde las células primarias que envolvían al óvulo empiezan a multiplicarse, adquiriendo una forma cúbica. Por lo general, las hembras bovinas nacen con un determinado número de folículos ováricos primarios y primordiales. Los Folículos primarios se caracterizan porque alrededor de los ovocitos las células de la granulosa empiezan a replicarse y adquieren una forma cuboidal, por lo cual el folículo empieza a aumentar su tamaño a un diámetro aproximado de 40 a 80  $\mu\text{m}$  (Filipiak et al., 2016).

Después, se tienen a los folículos secundarios, en donde el ovocito se encuentra rodeado por dos o más células foliculares, y se forma la zona pelúcida, una cobertura conformada por mucopolisacáridos, importantes para la fertilización y división celular. En esta fase los folículos avanzan

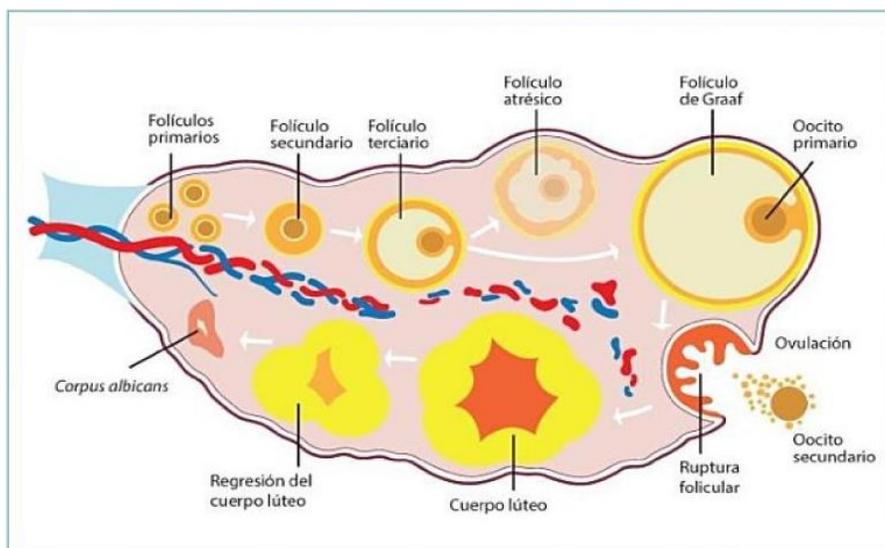
con su desarrollo y ocurre la división de las células foliculares en dos partes, granulosa y teca (Matamoros y Salinas, 2017, p. 97). Los folículos aumentan su tamaño a aproximadamente 80-250 $\mu$ m, ya que se presentan varias capas de células de la granulosa y a la vez células de la teca (células más alargadas y fusiformes). Aquí las células de la granulosa empiezan a segregar el licor folicular y mucopolisacáridos que forman la zona pelúcida alrededor del ovocito (Filipiak et al., 2016).

Los folículos terciarios o antrales: poseen una cavidad llena de líquido, en donde el óvulo permanece suspendido en una de las paredes del antro folicular. El ovocito continúa con su desarrollo, en el cual, aumentan sus capas de células, lo cual provoca que aumente el tamaño del ovocito y del folículo (Filipiak et al., 2016).

Los Folículos Maduros preovulatorio, son idénticos a un folículo antral, con la diferencia de que, en este, el ovocito se ha desarrollado por completo, está rodeado por una envoltura de células granulosas y está preparado para ser liberado (Filipiak et al., 2016).

Los folículos de Graaf están conformados por los folículos terciarios y por los preovulatorios. Cuando este alcanza la madurez, el ovocito se separa de la pared y es liberado durante la etapa de ovulación. Después de este proceso, el folículo de Graaf queda completamente vacío y pasa a formar un cuerpo lúteo. El ovocito dentro del folículo mide hasta 120  $\mu$ m y el folículo por lo general llega hasta los 20mm (Bouhier, 2016).

Finalmente, los folículos atrésicos, son aquellos folículos que no llegaron a culminar su correcto desarrollo, por lo cual se degeneran. Estos se forman a partir de los folículos de Graaf que no liberan el óvulo, provocando una involución (Bouhier, 2016). Todas estas estructuras mencionadas se pueden apreciar en la figura 8.

**Figura 8***Folículos y cuerpos lúteos*

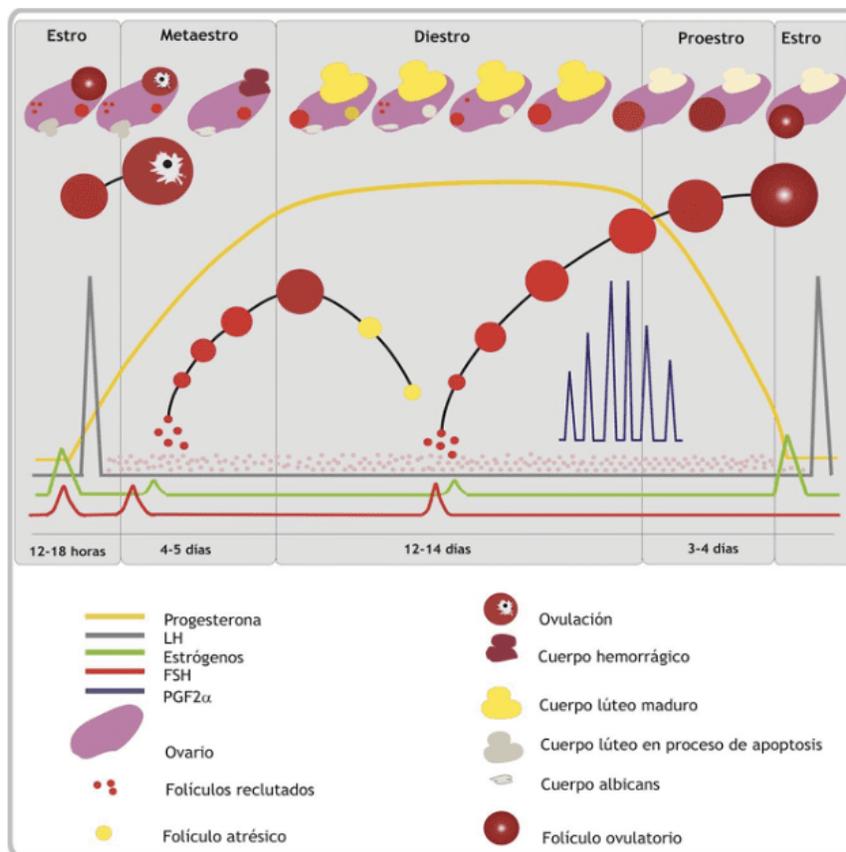
Nota: esquema del ovario bovino con Cuerpos lúteos maduros e inmaduros, y Folículos (primarios, secundarios, terciarios, atrésicos, de Graaf, etc.). Tomado de (Ungerfeld, 2020).

**Ciclo Estral**

El ciclo estral aparece por primera vez en la hembra en la pubertad, a los 15 meses de edad. Este tiene una duración de 21 días y se divide en distintas fases: proestro, estro, metaestro y diestro. El proestro es la etapa en donde los folículos maduran y el útero se adecúa mediante un proceso de irrigación más fuerte, durante 2 a 3 días. La siguiente etapa es el estro y dura un promedio de 14 horas, tiempo durante el cual ocurre y se manifiesta el celo, y se rompe el folículo de Graaf. También se reduce la concentración de la Hormona foliculoestimulante (FSH) y aumenta la de la Hormona Luteinizante (LH). Luego de 12 horas de haber culminado el estro, se da el proceso de ovulación y dos días posteriores al estro, se manifiesta la hemorragia vulvar. El metaestro es la etapa en la que se da la construcción del cuerpo lúteo, subiendo la cantidad de progesterona. El diestro es una etapa de descanso entre los ciclos astrales y dura una semana completa (Gloobe, 1989, pp. 119, 120).

Figura 9

Diagrama del ciclo estral de la hembra



Nota: Niveles de Progesterona, Estrógenos, LH y FSH, ovulación y formación del cuerpo lúteo. Tomado de (Mancilla, 2021).

### Ovocito bovino

Los ovocitos bovinos son el gameto femenino, es decir, son las células sexuales de la hembra, las cuales tienen la capacidad de ser fecundadas por un espermatozoide para permitir la formación del embrión. Una de las características de los ovocitos bovinos es que poseen una elevada cantidad de ácidos grasos. Se estima que un ovocito inmaduro contiene aproximadamente 63  $\mu$ g de ácidos grasos,

donde los fosfolípidos abarcan aproximadamente un 25% del total, mientras que, los ácidos grasos saturados representan un 30% (Castañeda, 2009).

### **Recolección de ovarios de matadero**

La recolección de los ovarios de matadero se realiza interviniendo en la cadena de faenamiento, en donde se retiran los ovarios de la vaca sacrificada en el menor tiempo posible, menos de 30 minutos desde el sacrificio del animal. Todos estos ovarios colectados se deben depositar en una solución de transporte, que consiste en una solución salina con antibiótico, dentro de recipientes temperados. Los antibióticos que más se suelen utilizar son: penicilina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, etc. Estos ovarios se deben transportar al laboratorio de forma inmediata, en menos de seis horas desde el inicio de la colecta. Un factor muy importante a tener en cuenta durante la recolecta y transporte de los ovarios es la temperatura, la cual no debe descender de 30°C, para lo cual, se debe usar un recipiente que permita la aislación térmica (Espin, 2018).

### **Obtención de ovocitos**

Los ovarios de la vaca, al igual que los de muchas otras especies de mamíferos, poseen folículos en diferentes fases de desarrollo que contienen ovocitos, de los cuales, solo una pequeña fracción llega a ser utilizada por el animal durante su ciclo reproductivo. Las técnicas de colecta de ovocitos permiten recuperar y obtener una gran cantidad de ovocitos que pueden ser madurados de forma *in vitro*, para ser aprovechados para la PIV de embriones, o para otras técnicas importantes de reproducción asistida (Fernandez et al., 2010).

Dentro de los ovarios bovinos se puede encontrar una gran cantidad de ovocitos. Por lo cual, se han diseñado varios métodos para extraer los ovocitos tanto de animales vivos como de *post mortem*. Para la colección de ovocitos de animales *in vivo*, normalmente se utilizan técnicas como; endoscopia, laparoscopia, aspiración asistida por ultrasonido y mediante cirugía. Por otro lado, para la colección de

ovocitos de vacas destinadas a sacrificio en el matadero, brinda muchas facilidades para el CIV de embriones. Las técnicas más comunes consisten en una aspiración de ovocitos a través de los folículos, y mediante disección del ovario. De estas, la aspiración es la más utilizada debido a que permite extraer los ovocitos con mayor rapidez, lo cual es vital debido a los posibles descensos de temperatura. Por lo general, los mejores ovocitos se encuentran en folículos de 2 hasta 8 mm de diámetro, debido a que estos ovocitos poseen una mejor capacidad de desarrollo. La mayor cantidad de ovocitos recuperados por ovario es de aproximadamente diez ovocitos (Yamasaki et al., 2015).

### **Aspiración folicular con jeringa**

La aspiración *post mortem* consiste en la obtención de ovocitos a partir de ovarios recuperados de las vacas sacrificadas en el matadero. Para ello, se succiona el contenido de los folículos mediante una jeringa y aguja, teniendo en cuenta que, el diámetro de la aguja es un factor importante a tener en consideración para evitar causar daños en los ovocitos aspirados. La aspiración consiste en aspirar al folículo con una jeringa hipodérmica, con una aguja estéril de 18 a 21G. Los ovocitos aspirados se depositan en una placa de Petri temperada, para la posterior selección de los ovocitos. El bisel de la aguja utilizada puede llegar a influir en la aspiración de los folículos, ya que, una aguja con bisel corto limita la recolección de ovocitos, mientras que, un bisel largo facilita este proceso (Espin, 2018).

### **Selección y clasificación de los ovocitos**

La selección y clasificación de los ovocitos bovinos recolectados se realiza en el laboratorio, utilizando un microscopio y por medio de parámetros observables. Para ello, se realiza una valoración de la morfología, la apariencia que posee su citoplasma, la apariencia de las células del cúmulus que lo rodean y el tamaño que posee el ovocito, no obstante, también es posible realizar una clasificación en base a las observaciones de la morfología del ovario y el diámetro folicular (Espin, 2018).

### ***La selección según la morfología del ovocito.***

La morfología del ovocito permite saber con anticipación si este es viable y tiene el poder de restablecer la fase meiótica, lo cual es fundamental para garantizar un buen comportamiento del ovocito durante la maduración. Esta selección se basa principalmente en dos aspectos. El primero se realiza en base a la apariencia del citoplasma del ovocito, el cual debe poseer un granulado firme y homogéneo, en donde no se presenten vacuolizaciones o se vea expuesto el espacio perivitelino. El segundo aspecto para la clasificación se basa en el aspecto y la morfología del cúmulo que rodea al ovocito, el cual no debe estar extendido o disperso, sino macizo y sin aglutinarse (Espin, 2018).

### ***Clasificación de los ovocitos.***

La clasificación del ovocito se puede realizar de dos maneras, según la formación de las células del cúmulus y del citoplasma:

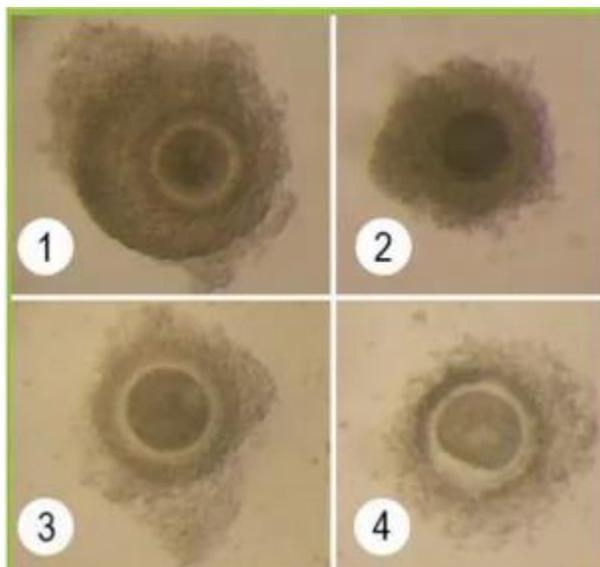
Según, (Tenemaza y Merchán, 2019), en base a la formación de las células del cúmulus, los ovocitos pueden catalogarse de la siguiente manera:

**Categoría 1 (A):** De buena calidad, posee tres o más capas compactas de células del cúmulus que se encuentran alrededor de toda la superficie del ovocito.

**Categoría 2 (B):** De calidad regular, el ovocito está rodeado por las tres capas de células del cúmulus de forma incompleta

**Categoría 3 (C):** De mala calidad, el ovocito está rodeado por una capa extendida de células del cúmulus.

**Categoría 4 (D):** De mala calidad, ovocitos desnudos, sin células del cúmulus.

**Figura 10***Categorías de ovocitos bovinos*

Nota: Clasificación de los ovocitos bovinos en diferentes categorías, en base a las células de los cúmulos y del citoplasma. Tomado de (Tenemaza y Merchán, 2019).

Según (Espin, 2018), la clasificación del ovocito en base a la apariencia del citoplasma está dada de la siguiente manera:

**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.

Los ovocitos bovinos de categoría 1 o incluso de categoría 2, que posean al menos 3 capas de células del cúmulus, son óptimos para llevar a cabo el proceso de MIV, mientras que, los que poseen menos de tres capas (grado 3 y 4) se descartan debido a su baja calidad (Quispe et al., 2018).

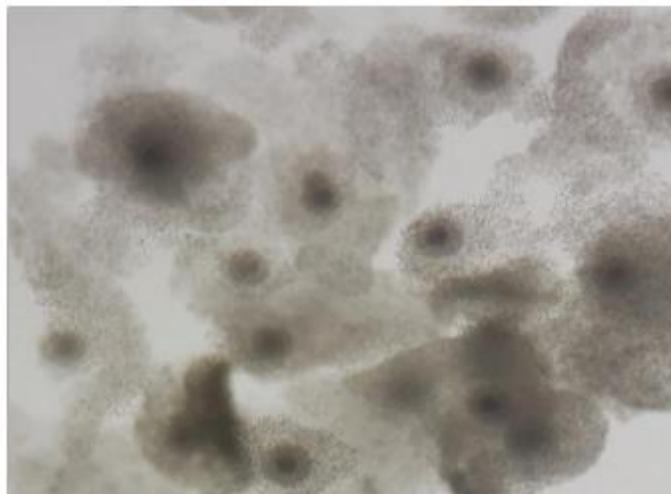
### **Producción *in vitro* de embriones bovinos**

El proceso de PIV de embriones bovinos consta de 3 etapas fundamentales, las cuales independientemente del protocolo que se esté utilizando, mantienen el mismo orden cronológico, el cual es: maduración de los ovocitos, fertilización de los ovocitos maduros y el cultivo de los embriones, durante 7 días aproximadamente para el caso de bovinos. Finalizada la MIV, se tiene cerca de un 90% de ovocitos bovinos que lograron madurar con éxito (llegaron a la metafase II); luego se da paso a la fecundación, misma que ocurre en un 80%, para lo cual se inicia la división hasta que logren alcanzar el estadio de entre 2 a 4 células, y finalmente, cerca del 30 a 40% logran llegar al estadio de blastocisto (Mucci et al., 2006)

La producción de embriones es una herramienta biotecnológica que se utiliza para obtener una gran cantidad de crías a partir de animales de excelentes características y elevado valor genético, es decir, permite generar un mayor número de embriones y crías seleccionadas por año, lo que no es posible de forma natural, sin asistencia de estas herramientas biotecnológicas (Ferré et al., 2020).

### **Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (MIV)**

La MIV de ovocitos consiste en una técnica utilizada para madurar los ovocitos fuera del animal, en un ambiente artificial *in vitro* en el laboratorio, simulando a las condiciones del ambiente natural (el aparato reproductor de la hembra), para lo cual los COCs son incubados en un medio de maduración (TCM 199), enriquecido con hormonas, antibióticos y sueros como fuente de proteína y demás macromoléculas esenciales para el crecimiento y desarrollo del ovocito (Barrera, 2018)

**Figura 11***Ovocitos bovinos maduros*

Nota: ovocitos bovinos madurados en TCM 199, después de 24 horas, vistos desde el estereomicroscopio. Tomado de (Tenemaza y Merchán, 2019).

Esta técnica nos permite madurar un gran número de ovocitos de forma *in vitro*, para posteriormente ser fertilizados y madurados, para poder obtener un embrión. Para conseguir la maduración de los ovocitos se han realizado muchas investigaciones mediante las cuales se han logrado diseñar desde soluciones sencillas con sales balanceadas hasta medios muy complejos, en base a las condiciones *in vivo* en donde se desarrolla y madura naturalmente, con el objetivo de obtener una adecuada maduración y un elevado porcentaje de ovocitos madurados. Entre los principales parámetros y elementos implementados en los medios de cultivo de los ovocitos, se encuentran: La temperatura, el pH, la osmolaridad, las FSH y LH, estrógenos, aminoácidos, factores de crecimiento, suero de vaca en estro, suero fetal bovino (SFB) y seroalbúmina bovina (BSA). Por lo general, para la maduración de ovocitos se suele utilizar el medio TCM-199, suplementado con FSH y LH, estradiol, piruvato y suero sanguíneo. Las hormonas FSH y LH, son muy importantes para el desarrollo de los ovocitos. La FSH convierte en entorno del folículo de andrógeno en estrógeno, y se encarga de aumentar la extensión de

células del cúmulo que envuelven al embrión, debido a que esta, es una hormona que favorece al desarrollo, mas no a la maduración. Por otro lado, se encuentran los estrógenos, los cuales permiten la maduración del ovocito. Los sueros de vaca en estro, BSF y BSA, brindan las proteínas necesarias, aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y otros nutrientes, que ayudan a la adecuada maduración de los ovocitos, aumento de la fertilización y a un mejor desarrollo de los embriones bovinos (Yamasaki et al., 2015).

La MIV de ovocitos se puede ver afectada por varios factores importantes, como el tiempo transcurrido y la temperatura utilizada en el transporte de los ovarios desde el matadero al laboratorio, el diámetro de los folículos aspirados, la fase de desarrollo y el tamaño del ovocito, las sustancias utilizadas en el medio de cultivo, los sueros y hormonas usadas, y el tiempo de incubación, no obstante, si se maneja con cuidado cada uno de estos factores, se puede garantizar una buena tasa de maduración. Uno de los indicadores del éxito de la MIV de los ovocitos es la extrusión del primer corpúsculo polar, llegado al estado de metafase II, lo cual normalmente ocurre a las 24 horas o un poco antes, iniciada la maduración (Bouhier, 2016).

### **Medio para la MIV de ovocitos**

El medio TCM-199 es el medio estándar para realizar la MIV de ovocitos bovinos, utilizado en la mayoría de los laboratorios, ya sea con o sin la adición de sueros. Sin embargo, los medios de cultivo suplementados con hormonas mejoran la maduración citoplasmática en contraste con otros medios de maduración. El medio TCM 199 permite aumentar la división celular, con lo cual, mejora el desarrollo embrionario, en comparación con otros medios de cultivo. Este es el medio que se utiliza como pilar para la MIV de ovocitos, debido a sus efectos positivos en la maduración y al éxito que ha tenido para el posterior desarrollo de embriones (Espin, 2018).

## Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

La formación de ERO, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y los peróxidos orgánicos, se dan de forma natural en las células, y ocurre en el momento en el que los electrones pierden rumbo en el transcurso de su transporte a través de la cadena respiratoria mitocondrial y otras estructuras de transmisión de energía. A pesar de que las ERO provoquen modificaciones en las células o sus componentes mediante la oxidación y tengan efectos extremadamente dañinos para las células y su correcto funcionamiento, dañando el ADN y afectando a proteínas y a la peroxidación lipídica, los sistemas biológicos cuentan con distintos mecanismos antioxidantes, que le permiten controlar la oxidación causada por las ERO. Algunos de estos mecanismos basan su funcionamiento en enzimas (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa), mientras que otros no ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno y glutatión) (Morado et al., 2009).

Las afectaciones por oxidación en un organismo ocurren cuando hay un desequilibrio entre las ERO y el mecanismo antioxidante de las células. Los complejos ovocito-cumulus bovinos poseen un sofisticado mecanismo antioxidante de tipo enzimático. Durante la MIV de ovocitos bovinos, las elevadas concentraciones de ERO, provocadas por las elevadas cantidades de glucosa en el medio de maduración, muestran graves afectaciones en los embriones bovinos hasta la fase de blastocisto. A pesar de ello, varias investigaciones recientes señalan que estas elevadas concentraciones de ERO se pueden controlar y disminuir en el CIV aplicando antioxidantes (Morado et al., 2009).

De forma *in vivo* el embrión bovino es protegido de las ERO y el estrés oxidativo mediante hormonas, factores de crecimiento, agentes de defensa, proteínas y antioxidantes generadas por el oviducto. Durante la MIV de los ovocitos bovino, la producción de ERO se dispara, debido a la ausencia del líquido oviductal, el cual funciona como mecanismo de protección contra el estrés oxidativo, provocando que los ovocitos tengan una menor calidad y que los posteriores embriones que se produzcan sean propensos a sufrir (Azam et al., 2021).

## Uso de antioxidantes en el medio de maduración

Una de las técnicas más importantes para contrarrestar los efectos perjudiciales del exceso de ERO formado en los procesos *in vitro*, es la aplicación de antioxidantes como: el ácido ascórbico, el cual se desempeña muy bien protegiendo a las células de las ERO y deteniendo la peroxidación lipídica; la cisteamina, que eleva la concentración de GSH, lo cual permite defender a las células del estrés oxidativo; y la catalasa, la cual permite disminuir los niveles de ERO y células apoptóticas en la MIV. También se han empezado a utilizar antioxidantes exógenos de obtenido de la naturaleza, como el resveratrol y la quercetina. No obstante, aún no se tiene claro qué antioxidante favorece de mejor manera la PIV de embriones bovinos (Cajas et al., 2020).

La calidad y cantidad de embriones obtenidos de forma *in vitro* puede mejorar al suplementar los medios con antioxidantes, ya que estos permiten mejorar las condiciones del cultivo (Azam et al., 2021).

### **Resveratrol.**

El resveratrol. El resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno), es un compuesto polifenólico natural que se encuentra en el vino tinto, piel, moras, arándanos, maní, cacao, uvas, etc., que cuenta con importantes propiedades antioxidantes a nivel extracelular e intracelular, debido a su peculiar forma. Este antioxidante puede capturar con facilidad los diferentes tipos de ERO, por lo cual se ha empezado a estudiar su efecto en los diferentes tipos de cultivo celular (Madrid-Gaviria et al., 2019).

El resveratrol, es un potente antioxidante producido por algunas plantas como mecanismo de defensa, y en diversos estudios ha demostrado ser efectivo como compuesto antioxidante y antiinflamatorio e incluso, ha demostrado poseer propiedades antidiabéticas y ser eficiente en el control y eliminación de radicales libres, los cuales pueden causar daños en las células mediante estimulaciones en la mitocondria (Liu et al., 2023). Se ha reportado que este antioxidante tiene efectos anticancerígenos, antidiabéticos y cardiovasculares, y su aplicación en la MIV de los ovocitos bovinos ha

demostrado mejorar la maduración de los ovocitos y el desarrollo de obtenidos de la fertilización de los ovocitos madurados, mediante la eliminación de las ERO y el aumento de las concentraciones intracelulares de Glutación (Wang et al., 2014).

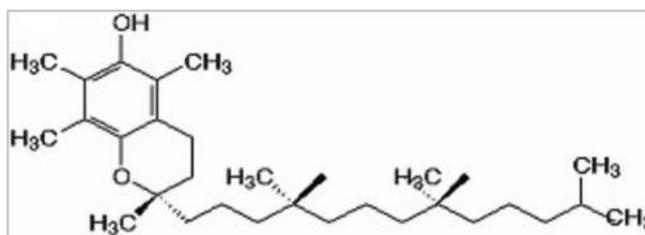
### ***α-tocoferol***

Usar el antioxidante  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) durante la MIV de los ovocitos bovinos, permite disminuir los efectos negativos del estrés oxidativo y el estrés causado por la competencia con otros ovocitos a la que son inducidos en este sistema de maduración, este antioxidante otorga un método similar al método de MIV tradicional, con la ventaja de que ofrece ovocitos de una mayor calidad, lo cual permite aumentar la tasa de embriones obtenido después de la fertilización (Báez et al., 2021).

Este antioxidante es una molécula natural, efectiva para contrarrestar el estrés oxidativo. Varios estudios han demostrado e informado un mayor rendimiento de blastocistos en el ganado bovino, y en otros mamíferos, como las ovejas y cerdos (Báez et al., 2021).

### **Figura 12**

*Estructura de  $\alpha$ -tocoferol.*



Nota: Estructura molecular del  $\alpha$ -tocoferol. Tomado de (Engin, 2009)

En su estructura, el  $\alpha$ -tocoferol cuenta con dos anillos y una cadena larga de hidrocarburos, lo cual le confiere una alta tolerancia. Pertenece a la vitamina E, una familia conformada por 8 compuestos, cuatro isoformas del  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) y cuatro isoformas del tocotrienol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), todas liposolubles y con poder antioxidante (Engin, 2009) y (Mesa y Munné-Bosch, 2023). No obstante,

el compuesto con mayor poder antioxidante y actividad biológica del grupo perteneciente a la vitamina E, es el  $\alpha$ -tocoferol, el cual posee una consistencia viscosa de color amarillo, liposoluble, por lo cual no puede disolverse en agua, pero si en solventes orgánicos (Trombino et al., 2022).

El  $\alpha$ -tocoferol ha demostrado ser un antioxidante útil para salvaguardar al embrión del impacto perjudicial de los radicales libres tanto en sistemas *in vivo*, como *in vitro*, ya que reduce el deterioro de las membranas celulares, protegen contra la peroxidación lipídica y evadir la apoptosis en las células (Azam et al., 2021).

## Capítulo III

### Materiales y métodos

#### Ubicación del área de investigación

##### *Ubicación política*

País: Ecuador

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas

Cantón: Santo Domingo

Parroquia: Luz de América

Sector: Hacienda "Zoila Luz", Vía Quevedo km 24

##### *Ubicación ecológica*

Zona de vida: Bosque húmedo tropical

Altitud: 224 msnm

Temperatura media: 24.6 °C

Precipitación: 2860 mm/año

Humedad relativa: 85%

Heliofanía: 680 horas luz/año

Suelos: Franco Arenoso

### Ubicación geográfica

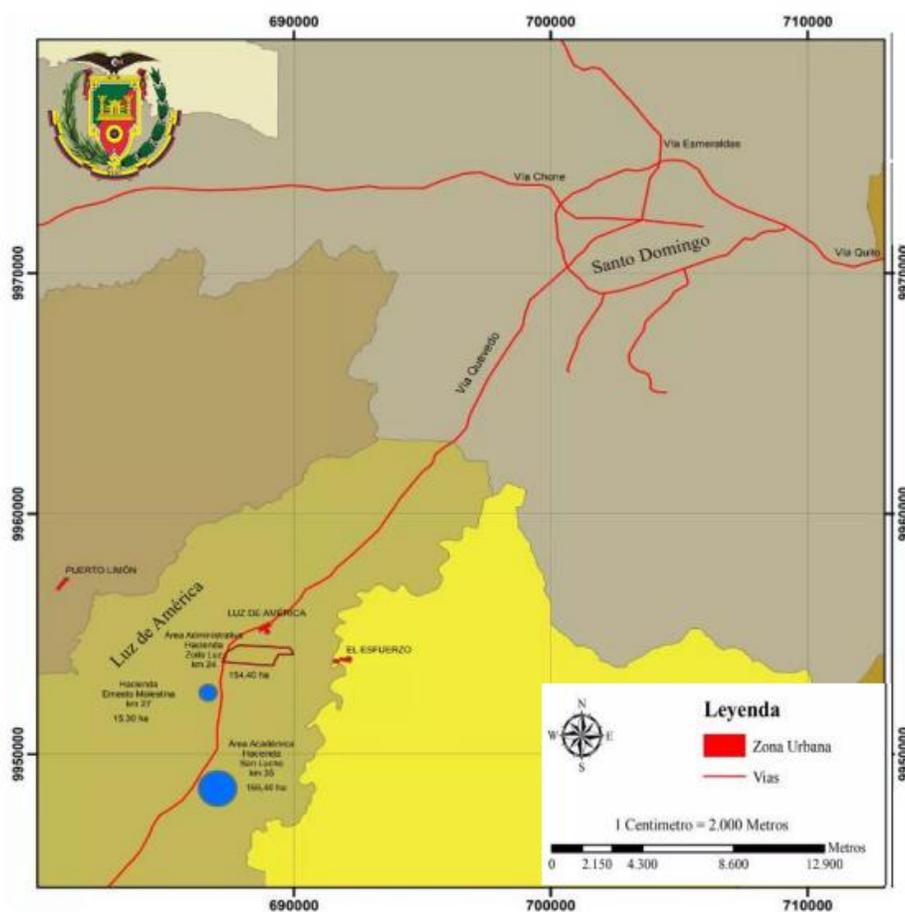
El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo, ubicado en la Hacienda Zoila Luz, Vía Santo Domingo-Quevedo km 24.

Latitud: 00° 24' 44" Sur

Longitud: 79 ° 18' 32" Oeste

**Figura 13**

*Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación*



## Materiales

### *Transporte de ovarios*

**Tabla 1**

*Equipos, insumos, reactivos y muestras para el transporte de ovarios*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cooler	Vaso de precipitación	Cloruro de sodio (NaCl)	Ovarios
Balanza analítica	Papel aluminio	Penicilina-Estreptomicina	
Plancha de agitación	Puntas para micropipeta	Agua bidestilada	
Micropipeta	Frasco de vidrio		
Termómetro	Espátula		
	Probeta		
	Recipiente de tapa ancha		

Nota: Elaboración propia

**Aspiración de ovocitos****Tabla 2***Equipos, insumos, reactivos y muestras para la aspiración de ovocitos*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Platina térmica	Vasos de precipitación	NaCl	Ovarios
Balanza analítica	Micropipetas	KCl	
Plancha de agitación	Puntas para micropipeta	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
Baño María	Placa de Petri	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
Micropipeta	Guantes	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	
Estereomicroscopio	Agujas hipodérmicas 18G	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	
Medidor de PH	Jeringa de 10 mL	Piruvato de sodio	
	Papel aluminio	Glucosa	
	Gasas estériles	Gentamicina	
	Espátula	Albúmina de suero bovino (BSA)	
	Matraz Erlenmeyer	Agua ultrapura	
	Bureta	Agua bidestilada	

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
	Filtro de jeringa de 0.22 micras	Penicilina-Estreptomicina	

Nota: Elaboración propia

### ***Maduración de ovocitos***

**Tabla 3**

*Equipos, insumos, reactivos y muestras para la maduración de ovocitos*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Platina térmica	Vaso de precipitación	Suero de ternera SFB	Ovocitos
Estereomicroscopio	Papel aluminio	Medio TCM 199 1X	
Incubadora	Puntas para micropipeta	Resveratrol	
Cámara de flujo laminar	Placa de Petri	Aceite mineral para cultivo celular	
Micropipeta	Guantes	LH	
Plancha de agitación	Tubos eppendorf	FSH	
Balanza analítica	Balón de aforo	$\alpha$ -tocoferol	
		Agua bidestilada	
	Tubos falcón	Agua ultrapura	

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
	Filtro 0,2 $\mu\text{m}$	Gentamicina	
	Cajas Nunc	Piruvato de sodio	
	Bureta	Dimetil Sulfoxido (DMSO)	

Nota: Elaboración propia

## Métodos

### ***Solución de transporte y lavado de ovarios.***

Para preparar 1 L de solución, se disolvió 8,5 g de NaCl y 80  $\mu\text{L}$  de penicilina/estreptomicina en 500 mL de agua bidestilada, se agito y aforó hasta completar el volumen requerido, una vez obtenida la solución se refrigeró hasta su uso.

### ***Solución Dulbecco Normal.***

Para preparar un volumen de 500 mL de solución dulbecco-Normal, primero se preparó Buffer de Fosfatos (PBS), para lo cual se midió 200 mL de Agua Ultrapura y se disolvió 4 g de NaCl; 0.1 g de KCl; 0.72 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0.12 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , se aforó a 250 mL y ajustó el pH a 7.4 con HCl. Luego se añadió 0.018 g de Piruvato de Sodio y 0.5 g de Glucosa en los 250 mL de PBS. Posteriormente, en 100 mL de Agua Ultrapura se disolvió 0.5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0.5 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y se transvasó a los 250 mL de la solución anterior. Esta solución se conservó a 4°C por un tiempo máximo de 30 días.

### ***Solución Dulbecco Enriquecida (Medio de lavado y aspiración de ovocitos).***

Para preparar un volumen de 100 mL de medio de lavado y aspiración de ovocitos, se tomó 100 mL de dulbecco-Normal, se añadió 50  $\mu\text{L}$  de Gentamicina, 0.3 g de SFB, dejando que este último se

disuelva por completo sin agitación, y se filtró usando el filtro de jeringa. La solución se preparó y usó el mismo día, y se descartó el sobrando.

### ***Solución de Antioxidantes.***

Para preparar la solución de resveratrol se disolvió 0.01 g de resveratrol puro en 219.06  $\mu\text{L}$  de DMSO, obteniendo así, una solución de 0.2 M de resveratrol, necesaria para preparar el medio de maduración con 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol. A partir de esta primera solución, se tomó 100  $\mu\text{L}$  y se añadió 900  $\mu\text{L}$  de DMSO para preparar una dilución con una concentración de 0.02 M de resveratrol, necesaria para preparar el medio de maduración con 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol.

Para preparar la solución de  $\alpha$ -tocoferol se disolvió 0.02 g del  $\alpha$ -tocoferol puro en 232.17  $\mu\text{L}$  de DMSO, obteniendo así, una solución de 0.2 M de  $\alpha$ -tocoferol, necesaria para preparar el medio de maduración con 100  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol. A partir de esta primera solución de  $\alpha$ -tocoferol, se tomó 100  $\mu\text{L}$  y se añadió 900  $\mu\text{L}$  de DMSO para preparar una dilución con una concentración de 0.02 M de  $\alpha$ -tocoferol, necesaria para preparar el medio de maduración con 10  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol. Para los medios con 0  $\mu\text{M}$  de resveratrol y de  $\alpha$ -tocoferol, se colocó el DMSO en un tubo eppendorf debidamente rotulado.

### ***Medio de maduración TCM 199 1X.***

Para preparar el medio de maduración se usó un tubo Falcon estéril en donde se agregó 9 ml de TCM 199 (en stock), 1 ml de Suero Fetal Bovino (SFB), 10  $\mu\text{L}$  de Gentamicina, 10  $\mu\text{L}$  de Piruvato de sodio (0.2 mM), 10  $\mu\text{L}$  de Epidermal, 10  $\mu\text{L}$  de LH, 15  $\mu\text{L}$  de FSH, se filtró con un filtro de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$  y se incubó por al menos 2 horas, con la tapa del tubo sin enroscar.

***Medio de maduración TCM 199 1X con antioxidantes.***

Se prepararon los medios de maduración con las respectivas concentraciones de resveratrol (0, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) y  $\alpha$ -tocoferol (0, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ), disolviendo 5  $\mu\text{L}$  de cada solución y dilución de antioxidante en sus respectivos tubos Falcon con 10 mL de medio de maduración TCM 199 1X, correctamente etiquetados.

***Colecta, transporte y lavado de los ovarios***

La colecta de los ovarios bovinos se realizó en el matadero de Santo Domingo de los Tsáchilas, en la Empresa Pública Mancomunada del Trópico Húmedo (EPMTH), ubicada aproximadamente a 32 km del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. Los ovarios se extrajeron del aparato reproductor de la hembra, en el área de extracción de vísceras, pocos minutos después del sacrificio del animal (entre 10 a 15 minutos) y rápidamente se colocaron en la solución de transporte que estaba dentro del cooler a una temperatura de 35 a 37°C. Culminada la colecta, se cerraron bien los recipientes con los ovarios y se realizó el transporte de estos desde el matadero al laboratorio. Una vez dentro el laboratorio, los ovarios se sacaron del cooler y se colocaron en la solución de lavado de ovarios, temperada a 37°C, en el baño María.

***Recuperación de los complejos Cumulus-Ovocitos (COCs)***

La recuperación de los COCs se realizó mediante la punción y aspiración folicular, para lo cual, se secó la superficie del ovario con ayuda de una gasa o toallas de papel limpias, se tomó una jeringa de 10 ml con una aguja de 18G, se cargó con 1 a 2 ml de la solución dulbecco enriquecida temperada entre 35 a 37°C, se realizó la punción de los folículos del ovario y se aspiró el contenido. Después se vació despacio y con cuidado el líquido aspirado de las jeringas en placas de Petri con solución dulbecco enriquecida, ubicadas sobre la platina térmica. Finalizada la extracción del líquido de los ovarios bovinos,

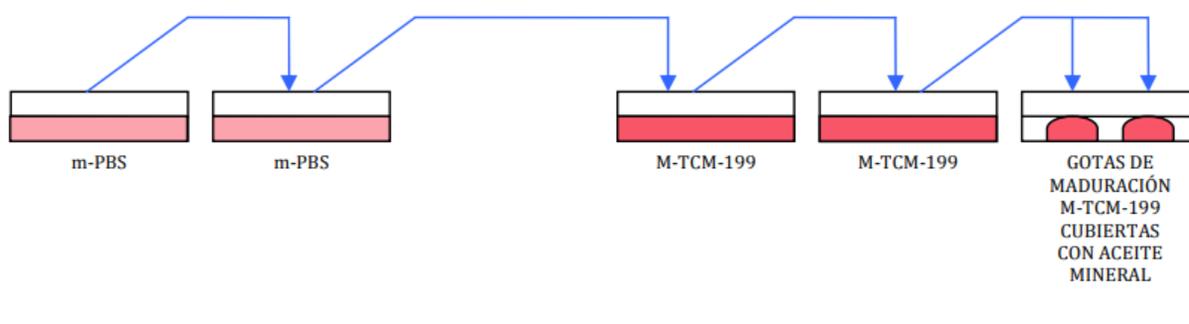
se procedió a seleccionar los COCs y pasarlos a nueva placa con solución dulbecco sobre la platina térmica, para separarlos de cualquier impureza. Después se clasificó y evaluó los ovocitos según la estructura del citoplasma y las células de cúmulos, para colocar los de grado 1 y 2 en una nueva placa de Petri temperada y con Medio de Maduración TCM 199 1x, en lugar de solución dulbecco. Finalmente, se colocaron los ovocitos en una cuarta placa de Petri con nuevo medio de Maduración, para asegurar el correcto lavado y limpieza de los COCs, como se muestra en la figura 12.

### ***Maduración de ovocitos***

En una placa Nunc, se formaron las gotas de 100  $\mu$ L de medio de maduración TCM 199 1X, previamente suplementados con las diferentes concentraciones de antioxidantes, y se recubrieron con 750  $\mu$ L de aceite mineral para cultivo celular, dentro de la cámara de flujo laminar. Se tomaron varios COCs de grado 1 y 2 de la cuarta placa de Petri y se sembraron en las gotas de medio, para evaluar el efecto del antioxidante en la maduración. Finalmente, se colocó a madurar en la incubadora a 38°C, con 90% de Humedad relativa (HR) y 6% CO<sub>2</sub>, por 24 horas.

### **Figura 14**

*Esquema del correcto lavado y maduración de los ovocitos bovinos*



Nota: Cada ovocito puesto a madurar fue previamente lavado en dos placas de con solución dulbecco enriquecida y dos de medio de maduración. Tomado de (Filipiak y Larocca, 2012, p. 9)

### ***Evaluación de la maduración***

Después de 24 horas de incubación, se retiró la placa Nunc de la incubadora y se observaron los ovocitos bajo el estereomicroscopio para en análisis de la maduración. El proceso de evaluación de la maduración de los ovocitos se basó en observar el aumento en el número de las capas de las células del cúmulus.

### **Diseño experimental**

#### ***Factores de experimento***

**Tabla 4**

**Factores y niveles a probar en el trabajo de experimentación**

<b>Factores</b>	<b>Simbología</b>	<b>Niveles</b>
Antioxidantes	a0	Resveratrol
	a1	$\alpha$ -tocoferol
Concentración de antioxidantes	b0	0 $\mu$ M
	b1	10 $\mu$ M
	b2	100 $\mu$ M

### ***Tratamientos que comparar***

**Tabla 5**

*Tratamientos que comparar en el trabajo de experimentación*

<b>N° Tratamiento</b>	<b>Interacciones</b>	<b>Unidades Experimentales</b>
T1	a0b0	Resveratrol + 0 $\mu$ M
T2	a0b1	Resveratrol + 10 $\mu$ M
T3	a0b2	Resveratrol + 100 $\mu$ M
T4	a1b0	$\alpha$ -tocoferol + 0 $\mu$ M
T5	a1b1	$\alpha$ -tocoferol + 10 $\mu$ M
T6	a1b2	$\alpha$ -tocoferol + 100 $\mu$ M

### ***Tipo de diseño***

Para el análisis estadístico de este estudio se utilizó un ANOVA DBCA con arreglo factorial AxB (1x4), donde el factor A corresponde al antioxidante y el factor B a la concentración del antioxidante.

### ***Repeticiones***

Se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento, obteniendo un total de 24 unidades experimentales.

### ***Análisis funcional***

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

## Capítulo IV

### Resultados

En el presente trabajo se utilizaron 429 ovarios de vacas faenadas, de los cuales se logró recuperar 480 ovocitos, obteniendo de tal manera una maduración de 76,04 %. El promedio de recuperación de ovocitos por cada ovario fue de 1,12. En la Tabla 6 se muestra el registro de los ovarios y ovocitos utilizados en la parte experimental del trabajo.

**Tabla 6**

*Registro de ovarios y ovocitos utilizados en cada tratamiento*

N°R	N° Ovarios	Antioxidante +	Resv.			α-Toc.			α-Toc.											
			0 μM	10 μM	100 μM	0 μM	10 μM	100 μM	0 μM	10 μM	100 μM									
		concentración	N° ovocitos seleccionados			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
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
<b>Sub Total</b>			11	34	16	27	31	14	14	23	9	11	32	17	14	34	14	20	30	14
<b>Total</b>	429	480	61			72			46			60			62			64		

Nota: Elaboración propia

**Figura 15**

*Ovocitos madurados después de 24 horas*



Nota: Ovocitos cultivados en medio de maduración TCM 199 1X, después de 24 horas. Fuente:

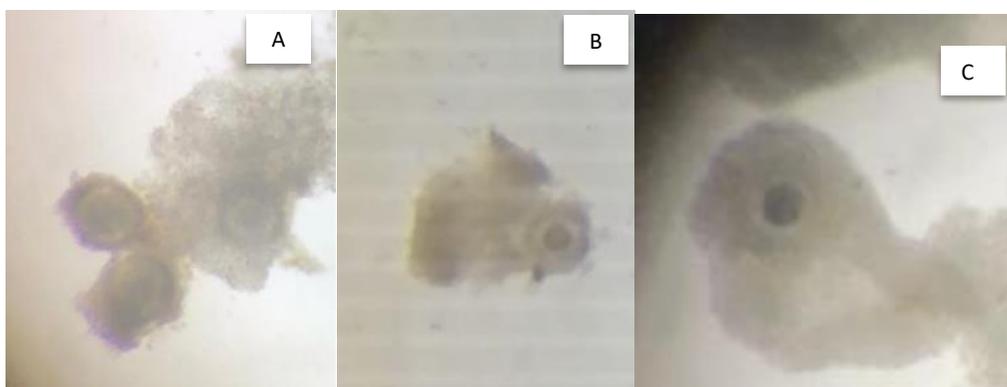
Elaboración propia

### ***Categorización de los ovocitos***

- Grado I
- Grado II
- Grado III

**Figura 16.**

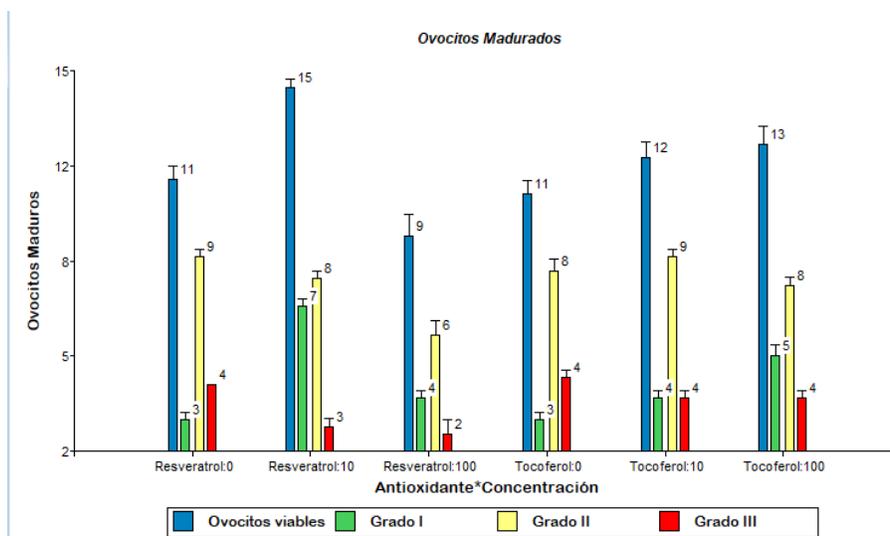
*Clasificación de ovocitos madurados*



Nota: A: ovocitos de grado III; B: ovocito de grado II; C: ovocito de grado I. Fuente: Elaboración propia

**Figura 17**

Resumen de la cantidad de ovocitos madurados



Nota: Comparación entre tratamientos para la obtención de ovocitos maduros viables (Grado I y II) y no viables (Grado III)

### Análisis de varianza

**Tabla 7**

Análisis de varianza de la maduración de ovocitos viables

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Antioxidante	0,0416667	1	0,0416667	0,04	0,8362
B: Concentración	28,5833	2	14,2917	15,18	0,0002
C: Réplica	8,125	3	2,70833	2,88	0,0710

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor P</b>
INTERACCIONES					
A*B	34,0833	2	17,0417	18,10	0,0001
RESIDUOS	14,125	15	0,941667		
TOTAL	84,9583	23			

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

En los resultados obtenidos del análisis de varianza de la maduración de ovocitos viables, considerando el valor de  $p < 0,05$ , se determinó que existe diferencia significativa en el factor B (Concentración de antioxidante) y en la interacción AxB (Antioxidante x Concentración de antioxidante), mientras que, en el tipo de antioxidante y réplicas, no existe diferencia significativa.

### Tabla 8

*Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría I*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor P</b>
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Antioxidante	2,04167	1	2,04167	8,08	0,0124
B: Concentración	23,0833	2	11,5417	45,66	0,0000
C: Réplica	2,45833	3	0,819444	3,24	0,0519
INTERACCIONES					

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor P</b>
A*B	23,5833	2	11,7917	46,65	0,0000
RESIDUOS	3,79167	15	0,252778		
TOTAL	54,9583	23			

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

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis de varianza para la maduración de ovocitos maduros de grado I, usando dos tipos de antioxidantes a diferentes concentraciones, se encontró que existe diferencia significativa en el factor A (Tipo de antioxidante), en el factor B (Concentración de antioxidante), y en la interacción AxB (Antioxidante x Concentración de antioxidante). Por otro lado, se determinó que no existe diferencia significativa en las réplicas.

**Tabla 9**

*Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría II*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Antioxidante	2,66667	1	2,66667	6,15	0,0255
B: Concentración	13,0833	2	6,54167	15,10	0,0003
C: Réplica	2,0	3	0,666667	1,54	0,2456
<b>INTERACCIONES</b>					

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor P</b>
A*B	5,08333	2	2,54167	5,87	0,0131
RESIDUOS	6,5	15	0,433333		
TOTAL	29,3333	23			

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

En la tabla 9, se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza de la maduración de ovocitos de grado II, en la cual se determinó que existe diferencia significativa entre los factores A y B, tipo de antioxidante y concentración de antioxidante respectivamente, y en la interacción AxB que corresponde a Tipo de antioxidante x Concentración de antioxidante, mientras que en las réplicas no se encontró diferencia significativa.

**Tabla 10**

*Análisis de varianza de la maduración de ovocitos de categoría III*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Antioxidante	4,16667	1	4,16667	11,36	0,0042
B: Concentración	7,58333	2	3,79167	10,34	0,0015
C: Réplica	1,0	3	0,333333	0,91	0,4600
<b>INTERACCIONES</b>					

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor P</b>
A*B	1,08333	2	0,541667	1,48	0,2596
RESIDUOS	5,5	15	0,366667		
TOTAL	19,3333	23			

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

En cuanto a los resultados obtenidos en la Tabla 10, correspondiente al análisis de varianza de la maduración de ovocitos de grado III, se encontró que existe diferencia significativa en el factor A (Tipo de antioxidante) y en el factor B (Concentración de antioxidante), mientras que en la interacción AxB y en las réplicas no se encontró diferencia significativa.

**Tabla 11**

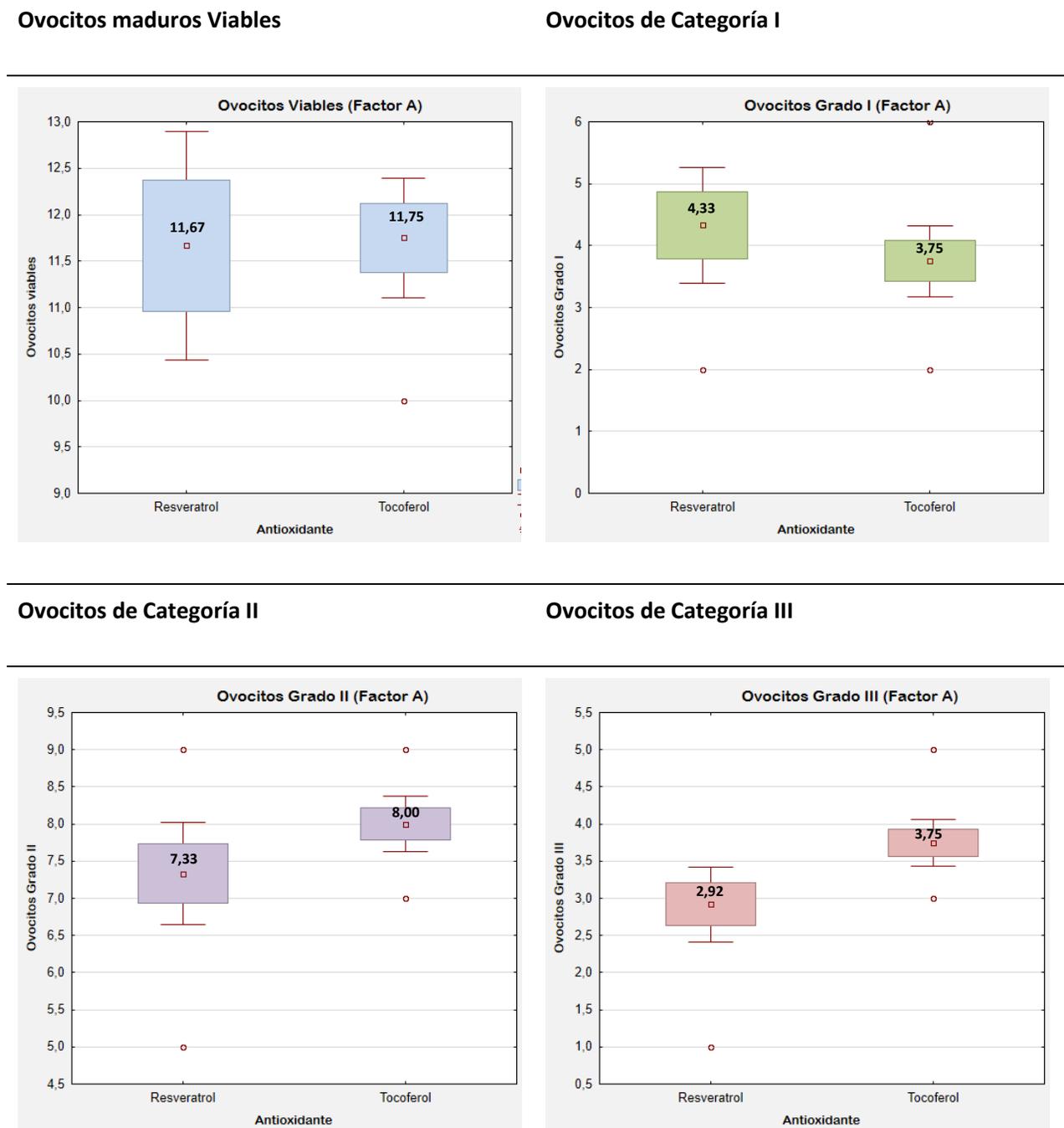
*Prueba de significancia de Tukey para el Factor A (Antioxidantes)*

<b>Factor A (Antioxidantes)</b>	<b>Ovocitos madurados viables</b>	<b>Categoría I</b>	<b>Categoría II</b>	<b>Categoría III</b>
Resveratrol	11,67 <sup>A</sup>	4,33 <sup>A</sup>	7,33 <sup>A</sup>	2,92 <sup>A</sup>
$\alpha$ -tocoferol	11,75 <sup>A</sup>	3,75 <sup>B</sup>	8,00 <sup>B</sup>	3,75 <sup>B</sup>

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

Figura 18

Estudio del efecto de los tipos de antioxidantes (Factor A) en las variables de estudio



Nota: Efecto de los tipos de antioxidantes (Factor A) en la obtención de ovocitos madurados viables, ovocitos de Categoría I, II y III.

En la tabla 11 y en la Figura 18, los resultados de la prueba de significancia de Tukey muestran las medias obtenidas para los ovocitos maduros viables (suma de ovocitos de Categoría I y II), ovocitos de categoría I, II y III. A partir de los resultados se logró determinar que, el medio de maduración con los dos antioxidantes (resveratrol y  $\alpha$ -tocoferol) no muestran diferencia significativa al momento de obtener ovocitos maduros viables, ya que se obtuvo una total de 11,67 con resveratrol y 11,75 con  $\alpha$ -tocoferol. En el caso de la obtención de ovocitos madurados de categoría I, se obtuvo diferencia significativa, en donde se observó que la aplicación de resveratrol permite recuperar un mayor número de ovocitos de categoría I (4,33), mientras que, la aplicación de  $\alpha$ -tocoferol disminuye el número de ovocitos de categoría I (3,75). En cuanto a los resultados de la obtención de ovocitos madurados de categoría II, se determinó que el uso de  $\alpha$ -tocoferol en el medio aumenta el número de ovocitos de esta categoría, ya que presenta un valor de 8,00, mientras que, el número de ovocitos de categoría II disminuye al aplicar resveratrol como antioxidante (7,33). Por último, en los datos obtenidos de la maduración de ovocitos de categoría III, se encontró una menor cantidad al aplicar resveratrol (2,92), mientras que en la aplicación de  $\alpha$ -tocoferol aumenta el número de ovocitos de categoría III.

**Tabla 12**

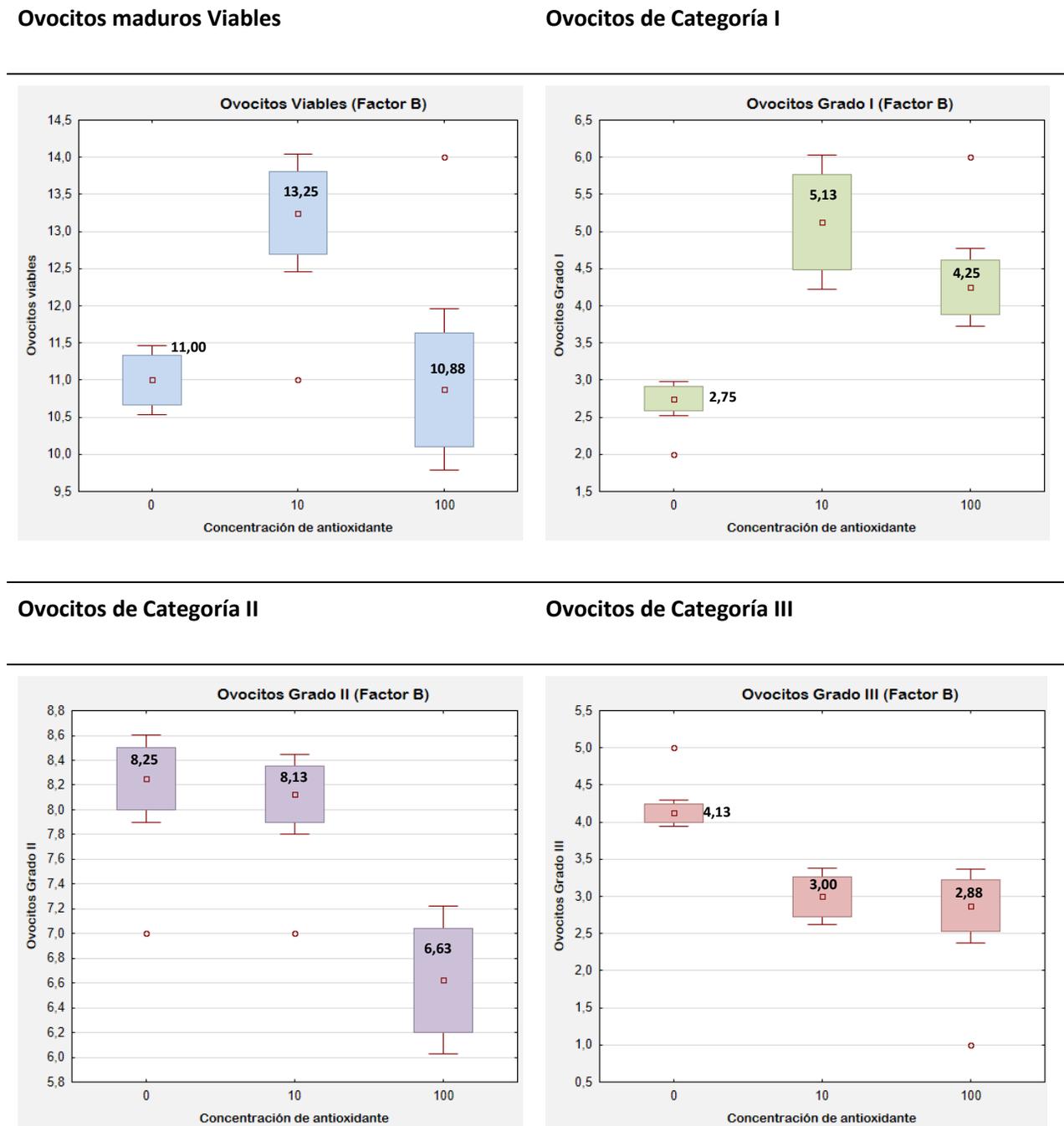
*Prueba de Tukey para el Factor B (Concentración de antioxidante)*

<b>Factor B (Concentración de antioxidantes)</b>	<b>Ovocitos madurados viables</b>	<b>Categoría I</b>	<b>Categoría II</b>	<b>Categoría III</b>
0 $\mu$ M	11,00 <sup>A</sup>	2,75 <sup>A</sup>	8,25 <sup>B</sup>	4,13 <sup>B</sup>
10 $\mu$ M	13,25 <sup>B</sup>	5,13 <sup>C</sup>	8,13 <sup>B</sup>	3,00 <sup>A</sup>
100 $\mu$ M	10,88 <sup>A</sup>	4,25 <sup>B</sup>	6,63 <sup>A</sup>	2,88 <sup>A</sup>

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

Figura 19

Estudio del efecto de las concentraciones de antioxidantes (Factor B) en las variables de estudio



Nota: Efecto de las concentraciones de antioxidantes (Factor B) en la obtención de ovocitos madurados viables, ovocitos de Categoría I, II y III.

Mediante la tabla 12, se determinó que la concentración idónea de antioxidantes es 10  $\mu\text{M}$ , ya que se logró recuperar un total de 13,25 ovocitos madurados viables, de los cuales 5,13 corresponden a ovocitos de categoría I y 8,13 a ovocitos de categoría II, mientras que, una concentración de 100  $\mu\text{M}$  permitió recuperar un total de 10,88 ovocitos madurados viables que comprende 4,25 ovocitos de categoría I y 6,63 de ovocitos de categoría II, por último, sin la aplicación de un antioxidante en el medio de maduración se logró rescatar un total de 11,00 ovocitos madurados viables de los cuales 2,75 son de ovocitos de categoría I y 8,25 de ovocitos de categoría II. En el caso de los ovocitos madurados de categoría III, la concentración que obtuvo un menor número fue a 100  $\mu\text{M}$  con un total de 2,88, seguido de 10  $\mu\text{M}$  con un total de 3,00, y, por último, sin el uso de antioxidantes en el medio de maduración (0  $\mu\text{M}$ ) se observa un mayor número de ovocitos de categoría III (4,13).

**Tabla 13**

*Prueba de Tukey para la interacción AxB (Antioxidante x Concentración de antioxidante)*

<b>Factor B (Concentración de antioxidantes)</b>	<b>Ovocitos madurados viables</b>	<b>Categoría I</b>	<b>Categoría II</b>	<b>Categoría III</b>
Resveratrol + 0 $\mu\text{M}$	11,25 <sup>AB</sup>	2,75 <sup>A</sup>	8,50 <sup>B</sup>	4,00 <sup>B</sup>
Resveratrol + 10 $\mu\text{M}$	14,50 <sup>C</sup>	6,75 <sup>C</sup>	7,75 <sup>B</sup>	2,50 <sup>A</sup>
Resveratrol + 100 $\mu\text{M}$	9,25 <sup>A</sup>	3,50 <sup>A</sup>	5,75 <sup>A</sup>	2,25 <sup>A</sup>
$\alpha$ -tocoferol + 0 $\mu\text{M}$	10,75 <sup>AB</sup>	2,75 <sup>A</sup>	8,00 <sup>B</sup>	4,25 <sup>B</sup>
$\alpha$ -tocoferol + 10 $\mu\text{M}$	12,00 <sup>B</sup>	3,50 <sup>A</sup>	8,50 <sup>B</sup>	3,50 <sup>AB</sup>
$\alpha$ -tocoferol + 100 $\mu\text{M}$	12,50 <sup>BC</sup>	5,00 <sup>B</sup>	7,50 <sup>B</sup>	3,50 <sup>AB</sup>

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

En la tabla 19, se observa la diferencia que existe en cada uno de los tratamientos que se evaluaron en la interacción A\*B (Tipo de antioxidante\*Concentración de antioxidante), en el cual se encontró que para obtener un mayor número de ovocitos madurados viables es mejor la aplicación de resveratrol a una concentración de 10  $\mu$ M, ya que en el presente estudio se logró obtener un total de 14,50 ovocitos madurados viables, de los cuales 6,75 corresponden a ovocitos de categoría I y 7,75 a ovocitos de categoría II. Por otro lado, se determinó que a una alta concentración de resveratrol (100  $\mu$ M) solo se logró recuperar un total de 9,25 ovocitos madurados viables, de los cuales 3,50 corresponden a ovocitos de categoría I y 5,75 a ovocitos de categoría II. En el medio de maduración aplicando  $\alpha$ -tocoferol a 100  $\mu$ M se logró recuperar un total de 12,50 ovocitos madurados viables, de los cuales, 5 corresponden a ovocitos de categoría I y 7,50 a ovocitos de categoría II, seguido de la aplicación de  $\alpha$ -tocoferol a 10  $\mu$ M, tratamiento en el cual se obtuvo un total de 12 ovocitos madurados viables, de los cuales 3,50 corresponden a ovocitos de categoría I y 8,50 a ovocitos de categoría II.

### Discusión

En la MIV de los ovocitos bovinos, tanto con el resveratrol (1.0, 10 y 100  $\mu$ M) como con el  $\alpha$ -tocoferol (1.0, 10 y 100  $\mu$ M), se obtuvieron promedios similares de ovocitos viables (grado 1 y 2) y no viables (grado 3), no obstante, a pesar de haber aplicado antioxidantes, se continuó obteniendo ovocitos maduros de grado 3, es decir, ovocitos maduros de mala calidad. Según (Wang et al., 2014), esto puede deberse a que los ovocitos obtenidos en del CIV poseen una competencia mucho menor en comparación a los ovocitos de un proceso *in vivo*, además, en un sistema *in vitro* se pueden formar ERO y los ovocitos tienden a estar más vulnerables a problemas de estrés oxidativo, es por ello que en muchos de los procesos de MIV de los ovocitos, se pueden utilizar diferentes tipos de antioxidantes como:  $\beta$ -mercaptoetanol, cisteína, cisteamina, antocianina y melatonina, a la MIV y a PIV de embriones.

La MIV de los ovocitos bovinos en medio de maduración con los antioxidantes (resveratrol y  $\alpha$ -tocoferol), no mostró diferencia significativa. Esto se debe a que en todos los tratamientos las tasas de

ovocitos viables y no viables al culminar la maduración fueron bastante similares. Esto coincide resultados de investigaciones científicas como la de (Salzano et al., 2014), en la cual se estudió el efecto del resveratrol (0, 0.1, 0.25 y 1 $\mu$ M) en la MIV de ovocitos bovinos, en la cual obtuvieron que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de maduración, sin embargo, encontraron que estos ovocitos tenían una calidad superior a los del control, lo cual fue evidente al realizar la criopreservación, en donde obtuvieron una criotolerancia del 67.3% frente al 50.3% del control (con  $P < 0.01$ ), y encontraron algo similar en la fase final del estudio, en donde obtuvieron que la tasa de eclosión fue de 58.9% frente al 30.9% del grupo control (con  $P < 0.01$ ), debido a la calidad superior de los ovocitos obtenidos en la maduración con el antioxidante, lo cual nos deja claro que, aunque no aumenta significativamente la cantidad de ovocitos en la MIV usando el resveratrol, la calidad de estos resulta mucho mayor, permitiendo que procesos como la criopreservación y PIV con estos ovocitos sean mucho más exitosos.

Otros investigadores como (Chinen et al., 2020), mencionan que el resveratrol protege a los ovocitos bovinos en los procesos *in vitro* de las posibles lesiones que estos puedan generar, debido a que los ovocitos se encuentran expuestos a varios tipos de estrés que podrían afectar drásticamente el proceso de maduración. De igual manera, (Takeo et al., 2014), realizaron estudios de la MIV de ovocitos con resveratrol y encontraron que, los niveles de ATP se encontraban muy por encima de los reportados en el grupo control, lo cual se debe a que el resveratrol mejora la función mitocondrial de los ovocitos, permitiendo que estos tengan una mejor competencia y por ende, tengan una mejor maduración, lo cual fue evidenciado al encontrar un aumento en las tasas de fertilización en comparación a los ovocitos madurados sin antioxidante. Esto explica en parte la superioridad en cuanto a calidad de los ovocitos obtenidos de la MIV con el resveratrol.

Por otro lado, la MIV con el  $\alpha$ -tocoferol también permitió obtener ovocitos bovinos de mejor calidad, como en el estudio realizado por (Báez et al., 2021), en donde encontraron que este antioxidante a concentración de 100  $\mu$ M mejoró el proceso de MIV de los ovocitos e impidió que

ocurran daños en el ADN de los embriones. Al igual que con el antioxidante resveratrol, investigadores como (Azam et al., 2021), mencionan que la MIV de ovocitos bovinos con ácidos grasos como el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) permiten obtener ovocitos de alta calidad, debido a que estos antioxidantes reducen las afectaciones en la membrana celular, causados en el CIV.

A pesar de que en todos los tratamientos se obtuvo una tasa de ovocitos maduros viables (de grado 1 y 2) bastante semejante, la mayor cantidad de ovocitos de grado 1 se obtuvieron con el resveratrol, mientras que, con el  $\alpha$ -tocoferol, se obtuvo la mayor cantidad de ovocitos de grado 2. Esto puede deberse a que, según (Pennisi-Forell, 2013), el resveratrol posee una mayor actividad antioxidante que el  $\alpha$ -tocoferol, debido a su estructura química en la que cuenta con dos anillos fenólicos y más grupos  $\text{OH}^-$ . Esto, junto con la capacidad del resveratrol para mejorar la función mitocondrial, puede explicar el motivo por el cual al final de la MIV con resveratrol se obtuvo una mayor cantidad de ovocitos de grado 1.

El mayor porcentaje de ovocitos bovinos de tipo 1 se obtuvo al realizar la maduración con una concentración de resveratrol de 10  $\mu\text{M}$ , en comparación al tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  y con 0  $\mu\text{M}$  de este antioxidante, mientras que, de los dos restantes, el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol obtuvo los resultados más desfavorables. Esto se debe a que 100  $\mu\text{M}$  de resveratrol es una concentración muy alta que se vuelve perjudicial para la maduración. En estudios como el de (Torres-Osorio et al., 2019), obtuvieron que, al madurar ovocitos bovinos usando 0.1, 1.0 y 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol, redujo la formación de ERO, y aumentó la concentración de progesterona y GSH intracelular, mejorando la calidad de los ovocitos madurados.

De igual manera (Takeo et al., 2014), obtuvieron que al aplicar resveratrol a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  en la maduración de ovocitos bovinos, elevó la cantidad de ATP y la expresión de la proteína SIRT1, y aumento la tasa de fertilización. Investigaciones como las de (Sovernigo et al., 2017), (Torres-Osorio et al., 2019), y (Taweechaipaisankul et al., 2018), estudiaron los beneficios de suplementar la MIV

de los ovocitos bovinos con 2  $\mu\text{M}$  de resveratrol y el posterior rendimiento la PIV de los embriones, en donde todos reportaron diferencias significativas en la reducción de ERO, aumento de la PIV y mejora la celularidad en los embriones. Investigadores como (Sovernigo et al., 2017), evaluaron los efectos de la suplementación del medio con 20 y 40  $\mu\text{M}$  de resveratrol para la maduración de ovocitos bovinos y obtuvieron que el resveratrol ayudó a regular la expresión del gen CYP1A1 que interviene en el reinicio de la meiosis, y que es fundamental en bovinos para que la MIV del ovocito sea correcta. (Torres et al., 2017) también probaron el efecto del resveratrol con concentraciones de 1 (R-1), 10 (R-10), 20 (R-20) y 40 (R-40)  $\mu\text{M}$  en la MIV de ovocitos bovinos y encontraron que, aumentó el porcentaje de embriones, y la GSH intracelular mientras que, la formación de ERO disminuyó en todos los ovocitos tratados en comparación con el control y que los niveles de GSH fueron significativamente mayores para el tratamiento con R-1 y R-10 en comparación con el control, mientras que, con R-10 se obtuvo un mayor porcentaje de blastocistos en comparación con el control y el resto de concentraciones. Los resultados de todas estas investigaciones coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio, por lo que podemos determinar que la MIV de ovocitos bovinos ocurre de mejor manera cuando se suplementa el medio con resveratrol a concentración de 10  $\mu\text{M}$ .

(Torres-Osorio et al., 2019), sostienen que, el resveratrol en concentraciones adecuadas ha demostrado ser beneficioso en la MIV de ovocitos porcinos, bovinos y de cabras, aumentando la cantidad de glutatión reducido en el interior del ovocito, reduciendo la aparición de ERO e incrementando el número de blastocistos, sin embargo, cuando las concentraciones de resveratrol están muy elevadas (20 a 40  $\mu\text{M}$ ) se pierden los efectos positivos y disminuye la tasa de ovocitos que completan el proceso de maduración. Esto coincide con lo obtenido en la maduración con 100  $\mu\text{M}$ , en donde, el porcentaje de ovocitos madurados fue mucho menor al del resto de tratamientos. Por otro lado, (Wang et al., 2014), determinaron que las concentraciones más idóneas de resveratrol para mejorar la calidad de los ovocitos se encuentra entre 0.1 a 10  $\mu\text{M}$ , en donde obtuvieron diferencias

significativas respecto a la formación de ERO, las cuales fueron menores con el antioxidante en comparación con el control, además, encontraron que los niveles intracelulares de GSH eran estadísticamente distintos, siendo superiores en el tratamiento con resveratrol que el grupo sin tratamiento, y ocurrió lo mismo con respecto a la expresión de enzimas antioxidantes producidas en el cúmulo, siendo mayor en los ovocitos del tratamiento con resveratrol.

El mecanismo mediante el cual el resveratrol mejora la calidad de los ovocitos aún se sigue estudiando y no se ha terminado de comprender por completo, sin embargo, investigadores como (Wang et al., 2014), sostienen que, el resveratrol mejora la función mitocondrial de los ovocitos bovinos mediante la activación de la sirtuina-1 (SIRT1) y aumenta hasta 14 veces la actividad de la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD2) mediante el siguiente proceso: RESV (resveratrol) → SIRT1/NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleótido) → FOXO3a (Forkhead box O3) → SOD2, en donde, esta última es la encargada de reducir el superóxido, otorgándole al ovocito una mejor función mitocondrial, evitando que falle y provoque una disfunción, también contrarresta los cambios de permeabilidad y evita la muerte apoptótica, además es la responsable de incrementar la concentración de los niveles de glutatión intracelular (GSH), lo cual permite disminuir el estrés oxidativo y regular el balance redox intracelular. De igual manera, investigadores como (Kwak et al., 2012), encontraron que al madurar ovocitos porcinos con 2,0 μM de resveratrol, aumentó el nivel de desarrollo embrionario, se incrementó la concentración intracelular de GSH, se redujo la cantidad de ERO y aumentó la regulación génica.

Los ovocitos utilizados en la maduración se extrajeron de ovarios de obtenidos de vacas de matadero mediante la aspiración de los folículos como en la metodología utilizada por (Guimarães et al., 2015), en donde probaron un sistema de MIV de ovocitos obtenidos de la aspiración de los folículos de ovarios de hasta 8 mm de diámetro, recuperados de vacas de matadero. (Ho et al., 2023), también realizaron la MIV de ovocitos, partiendo de una colecta de ovarios de vacas destinadas a la producción

de carne, y realizaron la extracción de los ovocitos mediante la aspiración de los folículos de entre 2 a 8 mm de diámetro.

La incubación de los ovocitos bovinos en el medio de maduración suplementado con los antioxidantes se realizó en una cámara de incubación con 6% CO<sub>2</sub>, a 38°C y 90% de HR con la tapa de la caja Nunc semiabierta, durante un tiempo de 24 horas, como los estudios realizados por (Andreas et al., 2021) y (Adeldust et al., 2015). (Şen y Kuran, 2018), también mencionan que las condiciones más adecuadas para la maduración de ovocitos, es a una temperatura de 36,5 °C a 38,5 °C, con 5 a 6% de CO<sub>2</sub> en el aire y que un medio apropiado para la maduración es el TCM-199 tamponado con bicarbonato. La elección de estas condiciones no es al azar, sino que, se basa en un intento por replicar las condiciones *in vivo* en la que normalmente se encuentran los ovocitos al interior de los ovarios, en la vaca, con la finalidad de que se dé una adecuada maduración, y posteriormente, una nueva cría en caso de ser fertilizado. Estas condiciones se asemejan a las condiciones *in vivo*, ya que investigadores como (Yamasaki et al., 2015), mencionan que, esa es la temperatura corporal de las vacas.

La temperatura de incubación es un factor importante para la correcta maduración, ya que según (Ye et al., 2007), los ovocitos bovinos tienen sensibilidad térmica, por ende, la temperatura de incubación que normalmente se utiliza es de 38.5 a 39°C. Según (Shi et al., 1998), esta es la temperatura corporal central del ganado bovino y. Sin embargo, (Şen y Kuran, 2018), demostraron que, los ovocitos madurados a 36.5°C muestran un mejor desarrollo embrionario. Esto se debe a que, según (Leese et al., 2008), los folículos preovulatorios de la vaca se encuentran entre 1.5 a 2°C por debajo de la temperatura corporal central, no obstante, se necesitan más estudios para determinar el efecto de la temperatura en la PIV de embriones y los parámetros más adecuados para obtener los mejores resultados.

La PIV de embriones bovinos es una técnica compleja que cuenta con varias limitantes, entre las cuales se destaca la calidad de los ovocitos, debido a que, gran parte de estos no logra transformarse en un embrión factible (Rocha-Frigoni et al., 2016). Investigadores como (Zhang et al., 2018), mencionan

que para realizar procesos de PIV de embriones bovinos, es necesario partir de ovocitos que hayan madurado correctamente, es decir, que hayan tenido una correcta maduración tanto nuclear como citoplasmática. Una de las principales causas de la disminución de la calidad de los ovocitos bovinos es la formación excesiva de ERO, la cual se da a presión de oxígeno a la que se lleva a cabo los procesos *in vitro*, ya que investigadores como (Ambrogi et al., 2017), mencionan que, en su estado y ambiente natural, las células producen ERO y estas aportan de manera beneficiosa a la renovación celular, sin embargo, si estas son producidas por encima de la cantidad necesaria, se vuelve perjudicial para las células, provocando oxidaciones de lípidos, carbohidratos, aminoácidos, etc., provocando alteraciones en las células que afectan la viabilidad de estas, y daños en las mitocondrias.

## Capítulo V

### Conclusiones

El uso de los antioxidantes resveratrol y  $\alpha$ -tocoferol demostró ser un método capaz de contrarrestar los efectos negativos de la formación de ERO y mejorando la maduración tanto citoplasmática como nuclear de los ovocitos bovinos en el proceso de MIV, permitiendo que aumente las tasas de éxito en los posteriores procesos.

Al comparar los ovocitos obtenidos de la MIV en medio TCM 199 1X suplementado con 0, 10 y 100  $\mu$ M de resveratrol y  $\alpha$ -tocoferol, no se encontró diferencias en cuanto al porcentaje de maduración y número de ovocitos viables, sin embargo, se evidencio una mejora en la calidad de los ovocitos.

Los ovocitos madurados de forma *in vitro* son el punto de partida para algunas TRA como la PIV de embriones y su calidad se relaciona directamente con el porcentaje de éxito o fracaso de estas técnicas, por lo cual, suplementar la MIV de ovocitos con antioxidantes como el resveratrol que permitan mejorar la calidad de los ovocitos madurados se vuelve crucial para aumentar la tasa de éxito de estas técnicas.

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio y a la bibliografía existente, se concluye que, la suplementación de la MIV de ovocitos con 10  $\mu$ M 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, cruciales para una mejor FIV y posterior PIV de embriones.

La técnica de MIV permite aprovechar gran parte de los ovocitos que se encuentran en el ovario y en combinación con otras técnicas de la reproducción asistida como el uso de semen sexado, la criopreservación, la FIV y PIV de embriones, nos brindan una amplia variedad de opciones para producir y diseminar un gran número de crías provenientes de animales de interés con superioridad genética.

## Capítulo VI

### Recomendaciones

Si se busca obtener la mayor cantidad de ovocitos viables, se puede prescindir de utilizar los antioxidantes, sin embargo, la calidad de estos ovocitos sería mucho menor a que si se realizara la maduración con los antioxidantes, lo cual sería evidente al momento de realizar la criopreservación, fertilización o PIV a partir de estos. Por el contrario, si lo que se busca es una calidad superior en los ovocitos, lo ideal sería utilizar resveratrol con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  o una concentración ligeramente inferior.

Se recomienda 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, debido a que, si se guarda, pierde estabilidad, aumentando la turbidez de la solución por la precipitación de las sales y genera una gran cantidad de burbujas que dificultan en análisis de los ovocitos aspirados en el microscopio.

Se recomienda 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.

## Capítulo VII

### Bibliografía

- Adeldust, H., Zeinoaldini, S., Kohram, H., Amiri Roudbar, M., & Daliri-Joupari, M. (2015). In vitro maturation of ovine oocyte in a modified granulosa cells co-culture system and alpha-tocopherol supplementation: effects on nuclear maturation and cleavage. *Journal of Animal Science and Technology*, 57, 27. <https://doi.org/10.1186/s40781-015-0061-5>
- Ambrogi, M., Dall'Acqua, P. C., Rocha-Frigoni, N., Leão, B., & Mingoti, G. Z. (2017). Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development in vitro. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 52(3), 409–421. <https://doi.org/10.1111/rda.12923>
- An, Q., Peng, W., Cheng, Y., Lu, Z., Zhou, C., Zhang, Y., & Su, J. (2019). Melatonin supplementation during in vitro maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 17370–17381. <https://doi.org/10.1002/jcp.28357>
- Andreas, E., Pandey, H. O., Hoelker, M., Salilew-Wondim, D., Gebremedhn, S., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2021). The regulatory role of miR-20a in bovine cumulus cells and its contribution to oocyte maturation. *Zygote (Cambridge, England)*, 29(6), 435–444. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000933>
- Azam, A., Ejaz, R., Qadeer, S., Irum, S., Ul-Husna, A., Ullah, S., . . . Akhter, S. (2021). Synergistic impact of  $\alpha$ -linolenic acid and  $\alpha$ -tocopherol on in vitro maturation and culture of buffalo oocytes. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 84, e253514. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.253514>
- Báez, F., Gómez, B., de Brun, V., Rodríguez-Osorio, N., & Viñoles, C. (2021). Effect of Ethanol on Parthenogenetic Activation and  $\alpha$ -Tocopherol Supplementation during In Vitro Maturation on

- Developmental Competence of Summer-Collected Bovine Oocytes. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(3), 2253–2265. <https://doi.org/10.3390/cimb43030158>
- Barrera, N. (2018). *Maduración in vitro de ovocitos en medio delipidado: impacto sobre el contenido lipídico citoplasmático, la sobrevivencia a la vitrificación y el desarrollo embrionario*. [Tesis de maestría, Universidad de la República (Uruguay)]. Facultad de Ciencias - PEDECIBA. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/21476>
- Bouhier, M. (2016). *Categorización de estructuras ováricas: relación con el porcentaje de recuperación ovocitaria, maduración y desarrollo embrionario in vitro en la especie bovina*. [Tesis de ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Argentina]. Biblioteca Digital de la Universidad Católica de Argentina. <https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/275/1/doc.pdf>
- Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., Ladrón de Guevara, M., Millán de la Blanca, M. G., Ramos-Ibeas, P., Gutiérrez-Adán, A., . . . González, E. M. (2020). Antioxidant Nobiletin Enhances Oocyte Maturation and Subsequent Embryo Development and Quality. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5340. <https://doi.org/10.3390/ijms21155340>
- Castañeda, L. (2009). *Fisiología de la reproducción bovina: desde la fecundación hasta la implantación embrionaria*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de La Salle. [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria)
- Castro, A. (1984). Anatomía del aparato reproductor femenino y su funcionamiento. En *Producción Bovina* (págs. 143, 144). San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia. <https://books.google.com.ec/books?id=fBTeYDDWIFQC>
- Castro, A. (1984). Aparato reproductor femenino [Figura]. En *Producción bovina* (pág. 143). San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia. <https://books.google.com.ec/books?id=fBTeYDDWIFQC>

- Chinen, S., Yamanaka, T., Hirabayashi, M., & Hochi, S. (2020). Rescue of vitrified-warmed bovine mature oocytes by short-term recovery culture with resveratrol. *Cryobiology*, *97*, 185–190.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.03.004>
- Ciani, F., Maruccio, L., Cocchia, N., d'Angelo, D., Carotenuto, D., Avallone, L., . . . Tafuri, S. (2021). Antioxidants in assisted reproductive technologies: An overview on dog, cat, and horse. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, *8*(1), 173–184.  
<https://doi.org/10.5455/javar.2021.h500>
- Currin, L., Baldassarre, H., & Bordignon, V. (2021). In Vitro Production of Embryos from Prepubertal Holstein Cattle and Mediterranean Water Buffalo: Problems, Progress and Potential. *Animals*, *11*(8), 2275. <https://doi.org/10.3390/ani11082275>
- Denicol, A. (2013). *Cuerpo luteo y cuerpos Albicans [Fotografía]*. Visual Guides of Animal Reproduction (VisGar): <https://visgar.vetmed.ufl.edu/>
- Engin, K. (2009). Alpha-tocopherol: looking beyond an antioxidant. *Molecular Vision*, *15*, 855–860.
- Espin, P. (2018). *Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes*. [Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana] Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>
- Fernandez, F., Hernández, J., & Reyes, M. (2010). MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN in vitro DE OVOCITOS DE CERDA OBTENIDOS POR PUNCIÓN Y CORTE DE FOLÍCULOS. *Revista de Salud Animal*, *32*(2), 78-83. <https://doi.org/http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v32n2/rsa02210.pdf>
- Ferré, L., Kjelland, M., Strøbech, L., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, *14*(5), 991-1004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

- Filipiak, Y., & Larocca, C. (2012). *Manual de Fertilización In Vitro en Bovinos*. Esquema del lavado y maduración de los COCs [Figura]. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.  
<https://www.researchgate.net/publication/230801504>
- Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montev.)*, 52(202), 14-22.  
[https://doi.org/http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-48092016000200002&lng=es&tlng=es](https://doi.org/http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092016000200002&lng=es&tlng=es).
- Gloobe, H. (1989). Ovarios. En *Anatomía aplicada del bovino* (pág. 118). San José, Costa Rica: Bib. Orton IICA / CATIE. <https://books.google.com.ec/books?id=MeU2Ru8k1qoC>
- Guimarães, A. L., Pereira, S. A., Leme, L. O., & Dode, M. A. (2015). Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. *Theriogenology*, 83(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.042>
- Ho, T. C., Kawate, N., & Koyama, K. (2023). Predicting nuclear maturation speed of oocytes from Japanese Black beef heifers through non-invasive observations during IVM: An attempt using machine learning algorithms. *Theriogenology*, 209, 235–242.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.07.007>
- Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T., & Iwata, H. (2015). Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology*, 83(3), 1360–1367. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.029>
- Kwak, S. S., Cheong, S. A., Jeon, Y., Lee, E., Choi, K. C., Jeung, E. B., & Hyun, S. H. (2012). The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 78(1), 86–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.024>

- Leese, H. J., Baumann, C. G., Brison, D. R., McEvoy, T. G., & Sturmey, R. G. (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Molecular Human Reproduction*, *14*(12), 667–672. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan065>
- Leyva, C., Barreras, A., & Varizanga, M. (1999). *Transferencia no quirúrgica de embriones en el ganado bovino*. México: Universidad Autónoma de Baja California.  
<https://books.google.com.ec/books?id=Ej0-5ZP9NSUC>
- Liu, M. J., Sun, A. G., Zhao, S. G., Liu, H., Ma, S. Y., Li, M., . . . Liu, H. B. (2018). Resveratrol improves in vitro maturation of oocytes in aged mice and humans. *Fertility and Sterility*, *109*(5), 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.020>
- Liu, X., Li, P., Yan, K., Du, Y., Peng, K., Li, M., . . . Liang, X. (2023). Resveratrol ameliorates the defects of meiotic maturation in lipopolysaccharide exposed porcine oocytes. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *115*, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.12.005>
- Luis Alaba. (2020). *La reproducción de la hembra bovina en Cuba: un enfoque agroecológico y epizootiológico*. Cuba: Editorial Universitaria.  
[https://books.google.com.ec/books?id=4R\\_5DwAAQBAJ](https://books.google.com.ec/books?id=4R_5DwAAQBAJ)
- Luis Quintela. (2007). Anatomía del aparato genital. En *OP/256-Ecografía y reproducción en la vaca* (págs. 23-32). Galicia, España: Universidad de Santiago de Compostela.  
<https://books.google.com.ec/books?id=cdfysdaX7WAC>
- Luis Quintela. (2007). Aparato genital de la vaca [Imagen]. En *OP/256-Ecografía y reproducción de la vaca* (pág. 23). Galicia, España: Universidad de Santiago de Compostela.  
<https://books.google.com.ec/books?id=cdfysdaX7WAC>
- Luis Quintela. (2007). Corte longitudinal y corte histológico de un ovario [Imagen]. En *OP/256-Ecografía y reproducción de la vaca* (pág. 24). Galicia, España: Universidad de Santiago de Compostela.  
<https://books.google.com.ec/books?id=cdfysdaX7W>

Luis Quintela. (2007). Oviducto [Imagen]. En *OP/256-Ecografía y reproducción de la vaca* (pág. 25).

Gelicia, España: Universidad de Santiago de Compostela.

<https://books.google.com.ec/books?id=cdfysdaX7WAC>

Madrid-Gaviria, S., López-Herrera, A., Urrego, R., Restrepo-Betancur, G., & Echeverri Zuluaga, J. J. (2019).

Effect of resveratrol on vitrified in vitro produced bovine embryos: Recovering the initial quality.

. *Cryobiology*, 89, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.05.008>

Mancilla, L. (1 de diciembre de 2021). *Diagrama del ciclo estral de la hembra bovina [Figura]*.

Agrocolumn. Protocolo de sincronización del celo e inseminación artificial a tiempo fijo en la

hembra bovina: <https://agrocolun.cl/protocolo-iatf-56/>

Matamoros, R., & Salinas, P. (2017). *Fundamentos de fisiología y endocrinología reproductiva en animales domésticos*. Santiago de Chile: RIL Editores.

<https://books.google.com.ec/books?id=NY8kEAAAQBAJ>

Melo-Sterza, F., & Poehland, R. (2021). Lipid Metabolism in Bovine Oocytes and Early Embryos under In

Vivo, In Vitro, and Stress Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3421.

<https://doi.org/10.3390/ijms22073421>

Mesa, T., & Munné-Bosch, S. (2023).  $\alpha$ -Tocopherol in chloroplasts: Nothing more than an antioxidant?

*Current Opinion in Plant Biology*, 74, 102400. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102400>

Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science.

*Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>

Morado, S., Cetica, P., Beconi, M., & Dalvit, G. (2009). Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction, fertility, and development*, 21(4), 608-614.

<https://doi.org/10.1071/RD08198>

- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F., & Alberio, R. (2006). In vitro production of bovine embryos : serum supplementation to the culture media. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 2(38), 97-104.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200002>.
- Nagano, M. (2019). Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, 65(3), 195–201.  
<https://doi.org/10.1262/jrd.2019-022>
- Pennisi-Forell, S. (2013). *Alternativas tecnológicas que permitan la elaboración de productos conformados ricos en ácidos grasos poli-insaturados, a partir de una especie marina grasa sub-explotada (SARACA, Brevoortia aurea)*. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata].  
SEDICI. <https://doi.org/10.35537/10915/31671>
- Piras, A. R., Ariu, F., Falchi, L., Zedda, M. T., Pau, S., Schianchi, E., . . . 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>
- Quispe, C., Ancco, E., Solano, J., Unchupaico, I., & Mellisho, E. (2018). Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 4(29), 1114-1121.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418>
- Rocha-Frigoni, N. A., Leão, B. C., Dall'Acqua, P. C., & Mingoti, G. Z. (2016). Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology*, 86(8), 1897–1905. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.009>

- Rodgers, R., & Irving, H. (2010). Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Society for Reproduction and Fertility*, *139*(2), 309-318. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0177>
- Salzano, A., Albero, G., Zullo, G., Neglia, G., Abdel-Wahab, A., Bifulco, G., . . . Gasparrini, B. (2014). Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Animal Reproduction Science*, *151*(3-4), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.018>
- Şen, U., & Kuran, M. (2018). Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *31*(6), 827–834. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0569>
- Shi, D. S., Avery, B., & Greve, T. (1998). Effects of temperature gradients on in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, *50*(4), 667–674. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00171-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00171-x)
- Soto-Heras, S., & Paramio, M. T. (2020). Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, *132*, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>
- Sovernigo, T. C., Adona, P. R., Monzani, P. S., Guemra, S., Barros, F., Lopes, F. G., & Leal, C. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *52*(4), 561–569. <https://doi.org/10.1111/rda.12946>
- Sprícigo, J. F., Morató, R., Arcarons, N., Yeste, M., Dode, M. A., López-Bejar, M., & Mogas, T. (2017). Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on in vitro-matured calf oocytes. *Theriogenology*, *89*, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.035>

- Takeo, S., Sato, D., Kimura, K., Monji, Y., Kuwayama, T., Kawahara-Miki, R., & Iwata, H. (2014). Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, *60*(2), 92–99. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-102>
- Taweetchaipaisankul, A., Kim, G. A., Jin, J. X., Yeom, S. C., & Lee, B. C. (2018). Establishment and identification of cell lines from type O blood Korean native pigs and their efficiency in supporting embryonic development via somatic cell nuclear transfer. *Journal of Veterinary Science*, *19*(4), 492–499. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.4.492>
- Telfer, E. E., Binnie, J. P., McCaffery, F. H., & Campbell, B. K. (2000). In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *163*(1-2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00216-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00216-1)
- Telfer, E. E., Sakaguchi, K., Clarkson, Y. L., & McLaughlin, M. (2019). In vitro growth of immature bovine follicles and oocytes. *Reproduction, fertility, and development*, *32*(2), 1-6. <https://doi.org/10.1071/RD19270>
- Tenemaza, A., & Merchán, S. (2019). *Efecto del cuerpo lúteo sobre la producción in vitro de embriones bovinos y su posterior tolerancia a la criopreservación*. [Tesis de licenciatura. Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional UCUENCA. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/33232>
- Torres, V., Muñoz, L., Urrego, R., Echeverry, J. J., & Lopez, A. (2017). 181 Resveratrol During In Vitro Maturation Improves The Quality Of Bovine Oocyte And Enhances Embryonic Development In Vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, *29*, 199. <https://doi.org/10.1071/RDv29n1Ab181>
- Torres-Osorio, V., Urrego, R., Echeverri-Zuluaga, J. J., & López-Herrera, A. (2019). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *10*(2), 433-459. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>

- Trombino, S., Poerio, T., Curcio, F., Piacentini, E., & Cassano, R. (2022). Production of  $\alpha$ -Tocopherol-Chitosan Nanoparticles by Membrane Emulsification. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(7), 2319. <https://doi.org/10.3390/molecules27072319>
- Ungerfeld, R. (2020). Crecimiento final del folículo, ovulación y formación del cuerpo luteo [Figura]. En *Reproducción de los animales domésticos*. Zaragoza, España: Grupo Asís Biomedica S.L. <https://books.google.com.ec/books?id=AadHEAAAQBAJ>
- Ungerfeld, R. (2020). Ovario bovino [imagen]. En *Reproducción de los animales domésticos* (pág. 4). Zaragoza, España: Grupo Asís Biomedica S.L. <https://books.google.com.ec/books?id=AadHEAAAQBAJ>
- Ungerfeld, R. (2020). Transporte de gametos [Figura]. En *Reproducción de los animales domésticos* (pág. 186). Zaragoza, España: Grupo Asís Biomedica S.L. <https://books.google.com.ec/books?id=AadHEAAAQBAJ>
- Urrego, R., Rodríguez-Osorio, N., & Niemann, H. (2014). Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics*, *9*(6), 803–815. <https://doi.org/10.4161/epi.28711>
- Urroz, C. (1991). Los oviductos (trompas uterinas o de Falopio). En *Elementos de Anatomía Y Fisiología Animal* (pág. 206). Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia. <https://books.google.com.ec/books?id=K25RmJ28OCQC>
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., . . . Liu, G. (2014). Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, *101*(2), 577-586. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.041>
- Yamasaki, L., Yamasaki, A., Gilberto Yong, J. D., Fernández, Á., Güiris, D., Lau, A., . . . Ocampo, P. (2015). *Reproducción animal: Temas selectos sobre biotecnología de la reproducción animal*. Chiapas, México: Divulgación Universitaria. <https://books.google.com.ec/books?id=FRqrCwAAQBAJ>

Ye, J., Coleman, J., Hunter, M. G., Craigon, J., Campbell, K. H., & Luck, M. R. (2007). Physiological temperature variants and culture media modify meiotic progression and developmental potential of pig oocytes in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, *133*(5), 877–886.  
<https://doi.org/10.1530/REP-06-0318>

Zhang, T., Fan, X., Li, R., Zhang, C., & Zhang, J. (2018). Effects of pre-incubation with C-type natriuretic peptide on nuclear maturation, mitochondrial behavior, and developmental competence of sheep oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *497*(1), 200–206.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.054>