



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**MADURACIÓN IN-VITRO DE OVOCITOS BOVINOS EN
CULTIVO DE CÉLULAS OVIDUCTALES**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA**

AUTORA: KELLY YAJAIRA MORA ROJAS

DIRECTOR: ING. JUAN CARLOS ALVARADO ALVARADO, PHD.

CUENCA-ECUADOR

2026

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**MADURACIÓN IN-VITRO DE OVOCITOS BOVINOS EN
CULTIVO DE CÉLULAS OVIDUCTALES**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA**

AUTORA: KELLY YAJAIRA MORA ROJAS

DIRECTOR: ING JUAN CARLOS ALVARADO ALVARADO, PHD.

CUENCA-ECUADOR

2026

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Yo, **Kelly Yajaira Mora Rojas** portadora de la cédula de ciudadanía N.º **0302995519**. Declaro ser la autora de la obra: “**Maduración in-vitro de ovocitos bovinos en cultivo de células oviductales**”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **09 de julio de 2026**



F:

Kelly Yajaira Mora Rojas

C.I. 0302995519

CERTIFICACIÓN

Yo, Ing. Juan Carlos Alvarado, con cédula de identidad N° 0103352811 en calidad de director del trabajo de titulación con el tema **“Maduración in-vitro de ovocitos bovinos en cultivo de células oviductales”** certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Kelly Yajaira Mora Rojas bajo mi supervisión

Atentamente,



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**JUAN CARLOS
ALVARADO ALVARADO**

Ing. Juan Carlos Alvarado

Director de Tesis

AGRADECIMIENTO

Gracias a la Facultad de Ciencias Agropecuarias a todo su personal tanto docente y administrativo, por estos años de aprendizaje y enseñanza tanto en lo profesional como personal. Gracias Universidad Católica de Cuenca por brindar una educación capaz de transformar y crear seres humanos capaces de mejorar este país e incluso el mundo. Gracias al Ing. Juan Carlos Alvarado, tutor de este trabajo de titulación, gracias por dirigir esta investigación, por su gran paciencia, apoyo y aportes para el desarrollo del trabajo. Gracias por las enseñanzas impartidas a lo largo de la carrera. Al Ing. Manuel Maldonado gracias por las enseñanzas metodológicas que fueron fundamentales en el desarrollo de esta investigación y con el apoyo y aportes brindados durante carrera y dicha investigación.

DEDICATORIA

A mi madre Rosa Rojas por educarme y apoyarme para combatir y pensar desde la razón y amor, por enseñarme a buscar un mundo mejor sin perjudicar ni a mí y a nadie. Gracias madre por ser el motor de mi vida, todo lo que he logrado y soy es gracias a usted. Su amor me inspira a superarme y mejorar cada día tanto en lo profesional como en lo personal. A mi abuelita María, mis tías y primos por apoyarme en todo momento y sus palabras de aliento a lo largo de la carrera, cada gesto y muestra de apoyo que permitió seguir continuando y mejorando cada momento y seguir adelante. A Daniela y Joshelyn, dos grandes personas que me apoyaron en este camino, que me brindaron palabras de apoyo cuando más lo necesitaba, la constante motivación y los momentos de alegría que me permitieron seguir este camino. Gracias por ser tan cálidas y brindarme su cariño en todo momento y por enseñarme el gran valor de la amistad y el compañerismo dentro y fuera de la vida universitaria.

A mis perritas Keisi y Tete, que a pesar de que no esté físicamente conmigo, sin embargo, cuyo cariño y compañía despertaron en mí el amor y la vocación que hoy me trae hasta aquí. Ellas que sin saberlo me indicaron el camino de la Medicina Veterinaria e impulsaron a no rendirme con solo estar junto a mí.

Con Amor y gratitud,

Kelly Yajaira Mora Rojas

ÍNDICE

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD	III
CERTIFICACIÓN	IV
AGRADECIMIENTO	V
DEDICATORIA	VI
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
OBJETIVOS	10
HIPÓTESIS	10
INTRODUCCION	10
Morfología y calidad de los ovocitos.....	12
Competencia Ovocitaria	12
Maduración de ovocitos.....	12
Maduración Nuclear	14
Maduración citoplasmática	14
Maduración in vitro	15
Células epiteliales del oviducto	15
Cultivo de células oviductales	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

La maduración in vitro (MIV) de ovocitos bovinos en sistemas de cultivo representan una estrategia prometedora para mejorar la competencia meiótica y el desarrollo embrionario dentro de la reproducción asistida. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de cultivo de complejo cumulo-ovocito (COCs) bovinos con una monocapa de células epiteliales del oviducto bovino, establecida en el medio TCM-19. Los COCs fueron clasificados según criterios morfológicos establecidos por la IETS de 1 a-4 y distribuidos en dos grupos experimentales: grupo control y grupo con células epiteliales del oviducto. Se evaluó el grado de expansión del cumulo en una escala de 0-4 y la tasa de maduración nuclear (MII). Los datos fueron analizados en una prueba de Chi cuadrado ($p > 0.005$). Los resultados mostraron que el grupo control presento mayor grado de expansión del cumulo en comparación con el grupo de células oviductales, presentando diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2 = 8.00$; gl = 3: p-valor = 0.046). En contraste, la tasa de maduración nuclear no se observó diferencia significativa ($p < 0.005$) entre los dos tratamientos, evidenciado una disociación funcional entre la expansión del cumulo y la reanudación meiótica del ovocito. Los resultados del presente estudio subrayan que la capacidad de soporte de las células epiteliales del oviducto en monocapa sobre los ovocitos dependen del estado funcional y condicionamiento hormonal previo en las células oviductales, y que la presencia física de la monocapa no es suficiente por si sola para garantizar la expansión completa del cúmulo en la maduración in vitro de ovocitos.

Palabras clave.

Ovocitos, células epiteliales, maduración, in vitro, oviducto

ABSTRACT

In vitro maturation (IVM) of bovine oocytes in culture systems represents a promising strategy for improving meiotic competence and embryonic development in assisted reproduction. This study aimed to evaluate the effect of culturing bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) with a monolayer of bovine oviduct epithelial cells cultured in TCM-19 medium. The COCs were classified according to morphological criteria established by the IETS into grades 1 to 4 and assigned to two experimental groups: a control group and a group with oviduct epithelial cells. The degree of cumulus expansion was evaluated on a scale of 0–4, together with the nuclear maturation rate (MII). The data were analyzed using a chi-square test ($p > 0.005$). The results showed that the control group exhibited a greater degree of cumulus expansion compared to the oviductal cell group, with a statistically significant difference ($\chi^2 = 8.00$; $df = 3$; $p\text{-value} = 0.046$). In contrast, no significant difference ($p < 0.005$) was observed in the nuclear maturation rate between the two treatments, indicating a functional dissociation between cumulus expansion and the resumption of meiosis in the oocyte. The results of this study underscore that the supportive capacity of a monolayer of oviduct epithelial cells for oocytes depends on the functional status and prior hormonal conditioning of the oviductal cells, and that the physical presence of the monolayer alone is not sufficient to ensure complete cumulus expansion during in vitro oocyte maturation.

Keywords.

Oocytes, epithelial cells, maturation, in vitro, oviduct.

OBJETIVOS

A. Objetivo General

- a) Determinar el efecto del cultivo a base de células oviductales sobre el porcentaje de maduración in vitro de ovocitos bovinos, con el fin de simular un ambiente que reproduzca las condiciones fisiológicas del tracto reproductivo.

B. Objetivos específicos

- a) Evaluar la capacidad de replicación de células oviductales en condiciones de cultivo in vitro.
- b) Comparar el porcentaje de ovocitos bovinos que alcanzan la maduración MII tras el cultivo empleando células oviductales frente a medios de conservación sin la presencia de células somáticas.

HIPÓTESIS

El cultivo de ovocitos con células epiteliales del oviducto durante la maduración in vitro mejora significativamente la tasa de maduración ovocitaria en comparación con medios convencionales sin la presencia de células somáticas.

INTRODUCCION

La noción del ser humano en implementar nuevos métodos biotecnológicos aplicados a la reproducción asistida, siendo uno de ellos la producción in vitro, una gran alternativa para mantener y elevar el valor genético, y sobre todo la eficiencia productiva como reproductiva en la explotación pecuaria (Giller et al., 2025).

La técnica de maduración in vitro (MIV) de ovocitos, considerada una de las etapas clave para el desarrollo embrionario y para el éxito de las biotecnologías reproductivas, se ha vuelto objeto de muchos estudios, con el objetivo de desarrollar y mejorar los procedimientos biotecnológicos dentro de la reproducción asistida (Herrera et al., 2024).

La maduración in vitro de ovocitos, cuyo objetivo es obtener ovocitos de cierta manera competentes, a partir de ciertas estructuras foliculares, la MIV presenta ciertos desafíos en cuanto a la viabilidad y calidad de los ovocitos producidos por medio de la producción in vitro. Los ovocitos obtenidos bajo este método presentan una baja competencia meiótica y citoplasmática, perjudicando

de manera negativa en la calidad del embrión a desarrollarse. La principal causa se radica en los sistemas de cultivo empleados para MIV, es el no lograr reproducir completamente condiciones fisiológicas que los ovocitos logran experimentar en *in vivo* (Ferronato et al., 2023; Sirard & Coenen, 2006).

Los ovocitos que muestra una correcta maduración tienen que pasar por dos procesos importantes, siendo estos la maduración nuclear y citoplasmática. La maduración nuclear es el resultado de toda la fase completa de la meiosis I, dando como resultado la disminución del número de cromosomas, dado por la extrusión del primer cuerpo polar (Negrón-Pérez et al., 2025). Este proceso de extrusión del primer corpúsculo polar junto con la expansión de las células del cumulo son los procesos evaluados dentro del estudio.

Por otra parte, el proceso de maduración citoplasmática comprende la reorganización de orgánulos entre ellos las mitocondrias y el retículo endoplasmático, distribución de gránulos corticales a la periferia del ovocito y acumulación de reservabas energética, siendo estos factores primordiales para la fecundación y posterior desarrollo embrionario temprano (Blocher et al., 2024; Zhang & Xu, 2025).

Dado que tanto la maduración nuclear como la citoplasmática dependen de condiciones bioquímicas precisas el medio de cultivo utilizado en la MIV representa un factor determinante en la calidad y competencia del ovocito. Si bien se conoce que estos medios están diseñados para suplir los nutrientes necesarios para el desarrollo ovocitario, no logran replicar la complejidad del entorno fisiológico folicular. Entre los más usados se encuentra el TCM-199, que ha demostrado resultados satisfactorios gracias a sus propiedades antioxidantes y contenido ascórbico (Herrera et al., 2024).

El oviducto se constituye como una estructura anatómica clave en la reproducción, el cual conecta al ovario con el útero, se encuentra formado por un complejo fibromuscular siendo estas la mucosa, muscular y serosa (Bastos et al., 2022). La mucosa está formada por células epiteliales ciliadas y secretoras. La proporción de este tipo de células va depender de la proporción anatómica del oviducto y la etapa del ciclo estral (Bastos et al., 2025). Estas células se encargan de producir sustancias formando el fluido oviductal, siendo este fluido importante para generar un ambiente óptimo para la maduración de gametos, fecundación y darse las primeras divisiones del desarrollo embrionario (Saint- Dizier et al., 2025). El ovocito al entrar en contacto con el oviducto las células producen la glicoproteína llamada MUC9, la cual interactúa con los gametos donde asegura la

fertilización (Danesh Mesgaran et al., 2016). En animales como bovinos, equinos y caninos, los ovocitos pasan por la maduración nuclear y el endurecimiento de la zona pelúcida en el medio oviductal, denominados cambios pre-fertilización (Saint-Dizier et al., 2025).

Por dicha razón, el incorporar un sistema de cultivo in vitro representa como un intento de biomimetizar condiciones fisiológicas naturales y busca mejorar de forma potencial la calidad y competencia de los ovocitos.

Este estudio de enfoque cuantitativo y experimental, cuyo objetivo fue evaluar la maduración de ovocitos bovinos en células del oviducto, con el fin de ofrecer un entorno semejante al que ocurre de manera natural en el aparato reproductor del mamífero, pero sin reproducir completamente la complejidad de las condiciones biológicas naturales, ofreciendo un método más fisiológico dentro de los protocolos de maduración in vitro.

Morfología y calidad de los ovocitos

La calidad del ovocito es un factor determinante en el éxito de la maduración in vitro, fertilización y el desarrollo embrionario subsecuente. Su evaluación se basa en criterio morfológicos establecidos por la International Embryo Technology Society (IETS), que considera la integridad de las células del cumulo y apariencia del citoplasma para la clasificación de los complejos culos-ovocito (COC) en 4 grados (Aguila et al., 2020; Demetrio et al., 2022).

Los (COC) de grado 1 o A presentan múltiples capas compactas de células del cumulo y un citoplasma homogéneo y claro, siendo considerados de mayor competencia para la MIV. Los grados 2 o B se caracteriza por células del cumulo oscuras y compactas con un citoplasma ligeramente oscuro. Los grados 3 y 4 presentan células del cumulo expandidas con áreas irregulares y un citoplasma oscuro y heterogéneo, lo que refleja una mejor calidad y viabilidad ovocitaria (Aguila et al., 2020; Bahrami & Cotte, 2022).

Competencia Ovocitaria

Para el éxito en la producción de embriones, la competencia ovocitaria debe ser un punto primordial. Este factor se da de forma gradual durante la ovogénesis, con un sin número de atributos celulares y moleculares, que permite al ovocito la capacidad de completar la fase de meiosis, fecundación y llegar a desarrollarse en un blastocito con capacidad para implantarse y ser viable a desarrollarse en embrión. (Kussano et al., 2024).

Maduración de ovocitos

La maduración in vivo de los ovocitos está regulada por factores como son

la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), así como la interacción entre el ovocito y las células de la granulosa. Este proceso comprende 4 etapas secuenciales: vesícula germinal (VG), ruptura de la vesícula germinal (RVG), metafase I (MI) y metafase II (MII). En la etapa de vesícula germinal, las células germinales primordiales proliferan por mitosis para formar los ovocitos primarios.

Durante el diploteno de la meiosis I se constituye el folículo primordial, donde el ovocito está rodeado por una capa de 4 a 8 células de la granulosa (Aguila et al., 2020). Posterior, el ovocito entra en un estado de arresto meiótico, manteniendo elevadas concentraciones intracelulares de AMP cíclico (AMPC), etapa que puede prolongarse por años hasta recibir el estímulo adecuado para reanudar la meiosis. Ante la presencia del estímulo hormonal, ocurre la ruptura de la vesícula germinal, donde los microtúbulos se reorganizan formando el huso meiótico, cuya estructura es responsable de una correcta segregación cromosómica (Valadão et al., 2018). Este proceso conduce al ovocito hacia la metafase I y a la metafase II, etapa en la que queda arrestado hasta la fecundación.

En los bovinos, los ovocitos se describe 4 etapas, siendo estas descritas como GV0, GV1, GV2 y GV3. Los ovocitos en etapas GV0 se encuentran en desarrollo y no son capaces de ser fertilizados, la etapa GV1 y GV2 son ovocitos que son más competentes y capaces de ser fertilizados y desarrollados. La etapa GV3 muestra ciertos signos de atresia, mostrando menor capacidad de ser fertilizado y desarrollarse (Pytel et al., 2024).

El complejo del cúmulo-ovocito (COC) constituye la unidad funcional central donde se da la foliculogénesis y maduración ovocitaria. Las células de la granulosa que mantienen la comunicación directa con el ovocito por proyecciones tranzonales y comunicantes, formadas por conexina 37 (Cx37) y conexina 43 (Cx43) (Gilula et al., 1978; Lonergan et al., 2003; Simon et al., 1997).

En bovinos los ovocitos son recuperados de folículos antrales entre 2 a 8 mm de diámetro en matadero o aspiración folicular transvaginal. Los ovocitos se encuentran en arresto meiótico en la profase I, siendo este el estadio vesícula germinal (VG) y rodeados por múltiples capas de células del cúmulo compactas (Lonergan et al., 2003).

El ovocito bovino secreta factores paracrinós, factor de diferenciación y función de células de cúmulos. Estas células suministran AMP cíclico (AMPC) al ovocito, para mantener el metabolismo energético del gameto (Matzuk et al., 2002).

La expansión del cúmulo es considerada un marcador morfológico clave en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito. Estudios demuestran ovocitos bovinos expansión completa del cúmulo presentan mayores tasas de reanudación meiótica, fecundación y desarrollo hasta blastocito en comparación con aquellos con la expansión parcial o ausente (Lonergan & Fair, 2008; Sirard et al., 2006; Tanghe et al., 2002).

En los sistemas de MIV bovinos, la FSH en combinación con LH o hCG es el componente gonadotrópico estándar de los medios de maduración. La FSH actúa sobre sus receptores en las células del cúmulo, elevando el AMPc intracelular y estimulando la expresión de Has2 (hialuronato sintasa 2), Ptgs2 (COX-2) y Tnfaip6 (TSG-6), que son los genes clave de la expansión. La concentración habitual de FSH en los medios de MIV bovinos es de 0,02 a 0,1 UI/mL, en combinación con LH a concentraciones similares (Gilula et al., 1978; Lonergan et al., 2003; Rizo et al., 2002).

Maduración Nuclear

El ovocito pasa por dos situaciones simultáneamente que, de cierta forma, evidencia existo en su maduración y con posibilidad a ser fertilizado. La maduración nuclear, es uno de los hechos principales que sucede durante la maduración de ovocitos, ya que este ocurre la condensación y segregación cromosómica, al darse esto permite que se reanude y complete la meiosis I y detenerse en la metafase de la meiosis II y de esta manera formando un huso meiótico con cromosomas alineados y microtúbulos en forma de barril. Todo este proceso de reorganización nuclear lleva a la extrusión del primer cuerpo polar y de esta forma está preparado para la fertilización (Blocher et al., 2024; Negrón-Pérez et al., 2025).

Maduración citoplasmática

En la maduración citoplasmática ocurre la distribución espacial de manera coordinada de los orgánulos y la acumulación de sustancia en orgánulos, el cual consiste en reservas de energía enzimáticas y síntesis de proteínas. La maduración citoplasmática se da la síntesis, activación y degradación del ARNm materno, debido que, si no se da este proceso, provocaría una expresión génica anómala (He et al., 2021). Además, se da la exocitosis de los gránulos corticales (GC), siendo este uno de los mecanismos que evitan la polispermia, debido a que ocurre cambios en los receptores espermáticos en la zona pelúcida (Ferreira et al., 2009). La exocitosis de los GC involucra tantos filamentos del citoesqueleto y proteínas homologas. Los gránulos corticales se distribuyen en toda la superficie, cerca de

la membrana plasmática, como un tipo de estrategia a la espera de la entrada del espermatozoide y la activación del ovulo (Ferreira et al., 2009).

Maduración in vitro

La maduración in vitro (MIV) es una tecnología que forma parte dentro de la humanidad desde hace ya casi un siglo, dándose por primera vez en conejos en el año 1935 y en humanos en 1944. Esta técnica es un proceso donde está compuesta con la recolección de vesículas germinales en una etapa de inmadurez (Gilchrist & Smitz, 2023). La MIV debe tener la capacidad de mantener tanto la maduración nuclear y la diferenciación citoplasmática del ovocito. La maduración in vitro de ovocito se realiza con un protocolo con frecuencia usado, el cual consiste en un tipo de sistema monofásico del medio TCM-199, que esta suplementado con suero fetal bovino (SFB) y hormonas gonadotrópicas (Singina & Shedova, 2019). Las hormonas gonadotrópicas que llegan a contener el medio de maduración son la hormona foliculoestimulante (FSH), que busca que los ovocitos reanuden la meiosis, sin provocar anomalías cromosómicas, la hormona luteinizante (LH) que promueve la expansión de las células del cumulo, esta hormona también puede ser remplazada por la gonadotropina coriónica humana (HCG). A parte contener hormonas, los medios están combinados con un conjunto complejo de aminoácidos, brindando energía para la maduración nuclear (Mahmoud et al., 2025).

Los ovocitos que se encuentran inmaduros bajo este sistema llegan a metafase II en la segunda división meiótica hasta un 80%, pero apenas un 40% llega a desarrollarse hasta la etapa de blastocito (Singina & Shedova, 2019)

Factores como son la calidad del ovocito que son recolectados y las condiciones del cultivo son primordiales para el éxito de la MIV. Bajo este contexto, el principal desafío que presentan los ovocitos al momento de la MIV es el estrés oxidativo, siendo causado por la presencia en cantidades mayores de ROS, generado por los propios ovocitos en el medio de maduración. La generación de ROS provoca muerte de los ovocitos y perdida embrionaria. Otros como temperaturas altas, humedad y otros son factores que afectan la maduración de los ovocitos en MIV (Rakha et al., 2022).

Células epiteliales del oviducto

La mucosa del oviducto se encuentra formado de dos tipos celulares las células ciliadas y secretoras (Bastos et al., 2022). Las células ciliadas están estructuradas con microvellosidades y secretan sustancias y factores de crecimiento, en los primeros días del ciclo estral (Rizos et al., 2016). Las células

epiteliales del oviducto, son células capaces de secretar ciertos sustratos o cofactores como glucosa, galactosa, piruvato, aminoácidos, glicoproteínas, albumina sérica y factores de crecimiento, siendo este el factor de crecimiento epidérmico (EGF), ligando c-kit, factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), factor inhibidor de la leucemia (LIF) y por último la interleucina-6 (IL-6); la secreción de estas sustancias aumenta la actividad metabólica, que consecutivamente mejoran el desarrollo, calidad y capacidad de implantarse el embrión (Avilés et al., 2010; Hosseinabadi et al., 2025). Se ha reportado que la OVGP1 y los glicosaminoglicanos que son secretados por las células epiteliales la funcionalidad de la zona pelúcida, permitiendo el control de la polispermia al momento de la fertilización (Maillo et al., 2016).

Durante el ciclo estral los cambios hormonales generan alteraciones tanto en la parte morfológica como en la composición de las células epiteliales en las estructuras del oviducto (Bastos et al., 2025). Esto puede variar en la especie, pero por lo general los mamíferos, la mayor producción se da al final del estro e inicio del diestro con el aumento de las células epiteliales secretora junto con el tamaño del lumen (Leese et al., 2001). La actividad endocrina principalmente la esteroideas que provocan cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares dentro del oviducto (Almiñana et al., 2018). Las altas concentraciones de estrógeno (E2), el oviducto presenta cambios morfológicos y proliferatorios en el segmento de la ampolla, provocando el aumento de células secretoras y la parte funcional del epitelio.

Durante la fase lútea, etapa en la que se produce la hormona progesterona induce a cambios dentro del epitelio del oviducto. Dentro de lo morfológico estudios expresan que tanto el grosor como altura de los pliegues mucosos, evidenciando que la progesterona induce a la atrofia del epitelio (Wang et al., 2007). La progesterona induce a la liberación activa del contenido oviductal mediante exocitosis, dicho fluido contiene mucopolisacáridos ácidos, glucógeno, lípidos y otros que son estimulados por el estrógeno durante la fase folicular (Mokhtar, 2015).

Cultivo de células oviductales

Se han desarrollado varios métodos diferentes de sistemas de cultivos primarios con distintos tejidos, siendo uno de estos el uso de células epiteliales oviductales y como resultado ciertos cultivos han servido como modelo in vitro (Fernández-Montoro et al., 2023).

Para la obtención de células epiteliales oviductales, que pueden ser tanto

mecánicas y enzimáticas. La técnica mecánica se realiza tanto la disección y cortes de forma longitudinal y posterior a dicho procedimiento, se sigue con la extrusión de las células del lumen del oviducto realizando una presión ligera en la parte externa del oviducto, de igual manera puede realizarse un raspado en la superficie de la parte interna del oviducto. En la técnica enzimática, llegan a usar tanto colagenasa como tripsina (Way, 2006). En cualquiera de las técnicas, siempre deben seguir protocolos que ayuden a la eliminación tanto de tejido adicional en el oviducto y la contaminación de cultivo con células no epiteliales (Way, 2006).

Los dos sistemas de cultivo más estudiados dentro de la reproducción asistida, que buscan generar un ambiente más fisiológico, principalmente para el desarrollo embrionario in vitro (Pranomphon et al., 2024). El primer sistema consta de monocapa de células epiteliales del oviducto (OEC) sobre placas, que mostro un aumento en la tasa y calidad del desarrollo en los embriones, y cambios en la expresión génica de las OEC. Esta técnica se la conoce como bidimensionales (2D) (Pranomphon et al., 2024).

El sistema de tridimensional (3D) es una técnica más precisa para generar un microambiente, existe una mejor comunicación celular y los factores solubles son más estables. Estos diseños buscan apoyar la maduración in vitro de ovocitos usando microesferas de alginato, matrices de agarosa o la gota colgante (Fernández-Montoro et al., 2023; Ishikawa et al., 2014; Mastrorocco et al., 2020). La técnica liquid marbles que son biorreactores en forma 3D, siendo estas gotas de medio de cultivo encapsuladas con partículas hidrofóbicas, evitando el contacto interno y ambiente externo, y reduciendo el riesgo de contaminación (Park et al., 2021).

Bajo este marco, el cultivo de células del oviducto no pierde la habilidad embriotrófica y se puede observar la presencia de sustancias como la OVGP-1 que son secretadas por células no ciliadas y proteínas como la aromatasa p450, siendo secretadas por células ciliadas (Senn et al., 2024). Bajo el contexto de desarrollo embrionario al tener presente una capa intacta de células epiteliales del oviducto y que dicha capa, presente una secreción activa, proporcionando condiciones in vitro optimas, generándose un desarrollo embrionario temprano (Walter, 1995).

El uso de células epiteliales del oviducto dentro de la maduración in vitro se ha convertido en una estrategia que busca aumentar la tasa de maduración de ovocitos de manera in vitro. La maduración de ovocitos en cultivos de células epiteliales del ámpula tanto frescas como congeladas mostraron un efecto beneficioso en la expresión génica, como son la GDF9 un factor de crecimiento y

el gen StAR, que genera mayor competencia para el desarrollo embrionario (Azari et al., 2021). En el desarrollo temprano de embriones han implementado el uso de cultivos de células epiteliales oviductales, obteniendo tasas mayores de etapa de blastocitos en un ambiente con presencia de células epiteliales del oviducto (Schmaltz-Panneau et al., 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Reproducción de la Unidad Académica de Ciencia Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, localizada en la parroquia Machángara, cantón Cuenca, provincia de Azuay, Ecuador.



Figura 1. Ubicación del laboratorio de reproducción de la Universidad Católica de Cuenca

El tipo de diseño del estudio fue de carácter experimental cuantitativo, debido a que se busca la eficiencia de la maduración in vitro de ovocitos usando un cultivo de células epiteliales del oviducto comparando sin la presencia de ellas.

La estructura del diseño fue completamente aleatoria aplicando 2 tratamientos y 4 replicaciones por cada tratamiento. En las replicaciones del experimento se cultivó entre 50 a 60 ovocitos, obteniendo de todas las repeticiones un total de 427 ovocitos, siendo 217 ovocitos del tratamiento control y 210 del cultivo celular.

Este proceso se desarrolló en dos etapas, la primera etapa consistió en el desarrollo de varios sistemas de cultivos de células epiteliales oviductales procedentes de animales faenados bovinos. La segunda etapa se cultivó los ovocitos en las células del oviducto y se evaluó el efecto que tienen sobre la maduración de los ovocitos que fueron obtenidos en los diferentes grupos experimentales.

Tanto oviductos como ovarios se obtuvieron de hembras bovinas faenadas

en el matadero municipal del cantón Cuenca, previa autorización del establecimiento. Los órganos fueron transportados al laboratorio de reproducción en solución salina isotónica estéril, mantenida entre 25 a 28 °C, y procesados dentro de las tres horas posteriores al faenamiento.

Los oviductos se realizaron sucesivos lavados con lactato de Ringer, removiendo impurezas y restos de sangre que afecten el cultivo celular. Posterior, los oviductos fueron disecados, removidos de los ovarios y colocados en cajas Petri estériles.

El oviducto diseccionado desinfectado mediante el contacto puntual con material estéril impregnado de alcohol al 70%. Para la obtención de las células, se realizó un raspado superficial, obteniendo una muestra con una consistencia mucosa y tonalidad amarillenta colocada en medio para su posterior lavado. Para el lavado, se realizó de una a dos centrifugados a 2000 rpm durante 6 minutos en 5 ml de medio MEM. Una vez centrifugado se retiró el sobrenadante conservando el pellet celular intacto.

Se sembró el concentrado celular en frascos de cultivo celular de 25 cm en 5 ml de medio de cultivo MEM, manteniendo el cultivo celular en la incubadora 37°C con 5 % de CO₂ y una humedad relativa del 90%.

El cultivo celular se examinó diariamente, realizando el cambio del medio celular cada 48 horas manteniendo la tapa del frasco ligeramente abierta favoreciendo el equilibrio térmico e intercambio gaseoso.

Al día 7, post siembra, se verificó la formación del monocapa celular adherida al frasco de cultivo celular. Las células de la monocapa formada fueron recuperadas mediante el proceso de tripsinización. Este proceso inicio con un lavado con 2 ml de solución de PBS, seguido de la adición de 2 ml de tripsina-EDTA durante 6 minutos a 37°C, la acción enzimática de la tripsina se neutralizo con medio de cultivo suplementado. Se procedió a la centrifugación de la suspensión para la obtención del pellet celular.

Las células epiteliales recuperadas se sembraron en 1 ml de medio de maduración en pocillos de cultivo. Tras un periodo de incubación de 24 horas, se generó un monocapa celular para el proceso de maduración in vitro de ovocitos.

En el proceso de obtención y selección de ovocitos, los ovarios se sometieron a lavados con lactato de Ringer. Seguido, se realizó la aspiración folicular con un tamaño entre 2 a 8 mm, empleando una jeringa de 10 ml equipada con una aguja calibre 21. El contenido aspirado se recolecto en tubos de Falcon de 50 ml.

La selección de ovocitos se llevó a cabo siguiendo los criterios indicados por International Embryo Technology Society (IETS), priorizando los ovocitos en grado 1 y 2, que presentan citoplasma homogéneo y capas compactas de las células del cumulo. Durante el proceso de selección, los ovocitos se mantuvieron en medio Holding sobre una placa térmica, para su observación y clasificación mediante esteromicroscopia (Nikon SMZ800N Japón) los ovocitos usados en el estudio fueron de I y II grado. Inmediatamente se procedió a incubar (Thermo Scientific) 37°C con 5% de Co₂ y una humedad relativa al 90%.

Ya seleccionados los ovocitos se procedió a la maduración in vitro, distribuyendo a los ovocitos en dos grupos experimentales: el primero en presencia de un monocapa celular epitelial del oviducto y el segundo únicamente en medio de maduración de ovocitos. Se utilizó TCM-199 como medio base suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 10 µg/ml de FSH-p, 75 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de amikacina.

Al término de la maduración in vitro de los ovocitos luego de 24 horas, se evaluó 2 indicadores de maduración del ovocito, siendo estos la expansión celular del cúmulo considerando la dispersión de las células. Una vez evaluado la expansión del cumulo, se despojaron las células del cúmulo mediante pipeteo frecuente para la evaluación de la expulsión del primer corpúsculo polar siendo un indicador visible que el ovocito alcanzó la etapa de metafase II, evidenciando la finalización de la meiosis I.

La selección de ovocitos se llevó a cabo siguiendo los criterios indicados por International Embryo Technology Society (IETS), priorizando los ovocitos en grado 1 y 2, que presentan citoplasma homogéneo y capas compactas de las células del cumulo. Durante el proceso de selección, los ovocitos se mantuvieron en medio Holding sobre una placa térmica, para su observación y clasificación mediante esteromicroscopia (Nikon SMZ800N Japón) los ovocitos usados en el estudio fueron de I y II grado. Inmediatamente se procedió a incubar (Thermo Scientific) 37°C con 5% de Co₂ y una humedad relativa al 90%.

Ya seleccionados los ovocitos se procedió a la maduración in vitro, distribuyendo a los ovocitos en dos grupos experimentales: el primero en presencia de un monocapa celular epitelial del oviducto y el segundo únicamente en medio de maduración de ovocitos. Se utilizó TCM-199 como medio base suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 10 µg/ml de FSH-p, 75 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de amikacina.

Al término de la maduración in vitro de los ovocitos luego de 24 horas, se evaluó 2 indicadores de maduración del ovocito, siendo estos la expansión celular

del cúmulo considerando la dispersión de las células. Una vez evaluado la expansión del cumulo, se despojaron las células del cúmulo mediante pipeteo frecuente para la evaluación de la expulsión del primer corpúsculo polar siendo un indicador visible que el ovocito alcanzó la etapa de metafase II, evidenciando la finalización de la meiosis I.

Para el análisis estadístico se usó un software estadístico Jamovi. Se aplico pruebas de chi-cuadrado (χ^2) en la variable expansión celular del cúmulo, considerando la distribución de frecuencias entre los distintos grados de expansión analizados en el experimento, de igual manera en la variable de maduración nuclear, expresado en ovocitos maduros y no maduros comparando si existe diferencias entre los dos tratamientos evaluados. Se estableció un nivel de significancia en $p < 0.05$ determinando diferencias significativas entre los dos tratamientos experimentales. Se realizaron graficas estadísticas, para promover una mejor interpretación de los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Expansión de las Células del Cúmulo

Tabla 1. Comparación de la expansión de células del cúmulo por tratamiento

Tratamiento	Grado 1 (%)	Grado 2 (%)	Grado 3 (%)	Grado 4 (%)
Control	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)
Cultivo oviductal	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	1 (12.5)	3 (37.5%)	2 (25%)	2 (25%)

Dentro del estudio se evaluó el efecto del cultivo celular del oviducto en la expansión celular del cúmulo en la maduración in vitro de ovocitos, utilizando una escala de 0 a 4. De acuerdo al análisis no paramétrico Chi cuadrado se observó diferencia significativa ($\chi^2 = 8.00$; $gl = 3$; $p\text{-valor} = 0.046$) en el grupo control con un grado de expansión entre 3 a 4, siendo el 50% de las repeticiones grado 3 y el otro 50% un grado 4. En el tratamiento de células oviductales se observaron expansión celular baja con un 25% de las repeticiones en grado 1 y el 75% en grado 2.

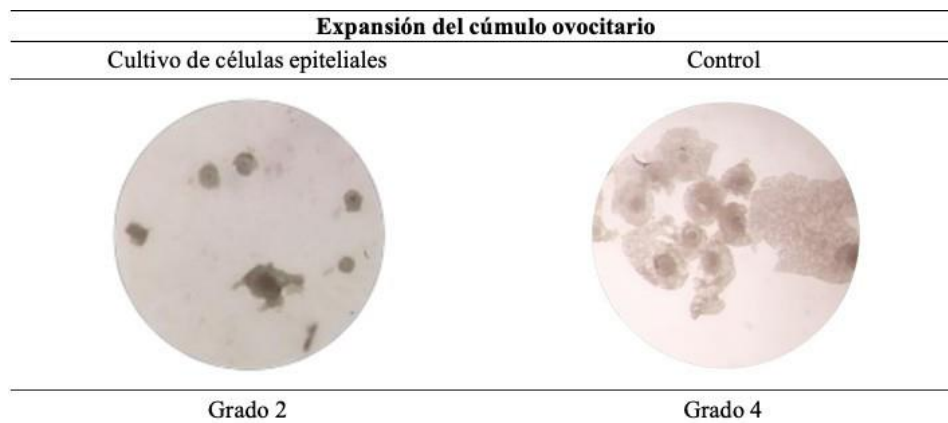


Figura 2. Análisis de chi cuadrado en expansión del cúmulo

Los hallazgos morfológicos visualizados en la evaluación de los ovocitos madurados tras el periodo de maduración in vitro se observan en la figura 3

Las células del cúmulo en ovocitos madurados con cultivo celular del oviducto presento una expansión parcial clasificada como Grado 2. A lo contrario los ovocitos pertenecientes al grupo control alcanzaron una expansión máxima de Grado 4.

Este comportamiento morfológico coincide con lo reportado por Gandhi et al., (2000) quienes evidenciaron una reducción significativa en la expansión del cumulo al usar un sistema de medio basado en fluido oviductal suplementado con albumina de suero bovino.

La baja expansión celular del cumulo observando en las células epiteliales, sugiere una interrupción en la cascada molecular. El proceso de cascada comienza con la hormona folículo estimulante (FSH) actuando en las células del cumulo mediante el receptor FSHR, activando la proteína quinasa A promoviendo la transactivación el receptor Factor de crecimiento epidérmico (EFG). Resultando en la activación quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) fosforilado induciendo la transcripción de 4 genes importantes para la expansión celular del cúmulo hialuronano sintasa 2 (HAS2), ciclooxygenasa 2 (PTGS2), TNFAIP6 y pentraxina 3 (PTX3) (Liu et al., 2021; Salustri et al., 2004).

La FSH, también se encuentra vinculada con la producción del estradiol (E2). Estudios demuestran que la hormona activa la aromatasa en los ovocitos para producir E2 y este regularizar la fosforilación de ERK1/2 mediante el receptor GPR30, generando expansión del cumulo y maduración del ovocito (Zhao et al., 2020).

Liu et al., (2021) observaron que los COCs que son mantenidos en cultivo sin presencia de E2 redujo la expansión del cúmulos y menores niveles de ARNm

de HAS2 comparados con ovocitos frescos, mientras que en la adición de E2 exógeno restaura la competencia expansiva de manera dependiente de Factor de diferenciación del crecimiento (GDF9) y Proteína morfogenética ósea (BMP15). Estos hallazgos demuestran que el E2 producido por los propios ovocitos bajo el efecto de la FSH regula de manera autocrina y paracrina en la expresión de HAS2 y la expansión del cumulo y opera de forma complementaria la vía directa EGFR-ERK1/2.

En bovinos confirmaron que la privación de FSH reduce de manera significativa en la síntesis del estradiol (FSH+: $116,0 \pm 0,0$ pg/mL; CTL: $97,6 \pm 18,0$ pg/mL) y por consiguiente menor tasa de maduración tanto nuclear como citoplasmático (Cantanhêde et al., 2021). Sin embargo, a diferencia de las células granulosa folicular, las células epiteliales del oviducto no expresan FSHR de forma diferenciada (Lopera-Vásquez et al., 2022), no obstante, expresan receptores de estrógenos alfa y beta funcionales en su membrana y núcleo, teniendo presencia y respuesta al E2 que se ha sido documentada en el epitelio oviductal in vivo e in vitro (Lopera-Vásquez et al., 2022; Ulbrich et al., 2003).

En condiciones fisiológicas in vivo, el estradiol producido en los folículos preovulatorios llega al oviducto en concentraciones elevadas, mediante los receptores de estrógenos alfa el programa secretor preovulatorio incluyendo la producción activa de AREG, EREG, LIF PGE2 IGF2 y OVGP1 (McGlade et al., 2025). Sin embargo, se debe tener en cuenta el estado hormonal en que las células oviductales son cultivadas, según Cerny et al., (2015) evidenciaron que este programa secretor difiere marcadamente entre la fase folicular y la luteínica, sin la presencia de la estimulación estrogénica previa, la monocapa epitelial del oviducto funciona en fase luteínica tardía o anéstrica, con una mínima de secreción de factores necesarios para la activación del eje EGFR.

Este mecanismo de captación competitiva de E2 no implica que las células compitan activamente como antagonistas, sino que, al expresar ER α y ER β funcionales en un ambiente cerrado con concentraciones de E2 producidas para los COCs presentes en el pocillo, la fracción de E2 disponible para la señalización autocrina en las células del cúmulo pudo haberse reducido significativamente. La consecuencia directa de esta reducción sería una menor activación de la vía GPR30 $\rightarrow$ ERK1/2 en las células del cúmulo, lo que contribuiría a disminuir la expresión de HAS2, PTGS2 y GREM1, genes cuya inducción por FSH es parcialmente mediada por esta vía estrogénica (Zhao et al., 2020)

Otro factor importante son las células oviductales funcionalmente activas

secretan ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular que son capaces unirse a receptores CD44 que se encuentran presentes en las membranas de las células del cumulo. Estas uniones llegan activar las vías de señalización intracelular las PKC, PI3K y NF-KB, induciendo al propio gen de HAS2 del cumulo, generando un loop autocrino amplificando de forma progresiva la producción HA, y generando la expansión del cúmulo (Schoenfelder & Einspanier, 2003; Yokoo et al., 2010).

Aunque las células epiteliales del oviducto pueden producir ácido hialurónico y expresar receptores CD44, la expansión funcional del cúmulo requiere la activación coordinada de genes como HAS2, PTGS2, TNFAIP6 y PTX3, que son regulados por señales dependientes de FSH, EGFR-ERK1/2 y factores ovocitarios como GDF9 y BMP15.

2. Maduración ovocitaria

Tabla 2. Efecto de las células oviductales sobre la maduración nuclear frente al grupo control.

Tratamiento	Ovocitos (n)	Madurados (%)	No madurados (%)	χ^2	P valo
Control	217	137 (63.1%)	80 (36.9%)	0.948	0.330
Cultivo celular	210	142 (67.6%)	68 (32.4%)		

Los datos expuestos en la tabla 2 no se evidencio diferencia significativa ($p > 0.05$) dentro de los resultados entre los dos tratamientos, pero demuestra un ligero incremento en la maduración de los ovocitos con presencia de células del oviducto ($67,5 \pm 5.08\%$), a comparación al tratamiento sin presencia celular ($63.2 \pm 6,20\%$).

Este resultado lejos de ser contradictorio, muestra una disociación entre la expansión física del cumulo y la reanudación meiótica del ovocito. Aunque tanto la expansión del cumulo como la reanudación meiótica son procesos posteriores a la activación de EGFR mediados por ERK1/2, cada una opera con umbrales de activación distintas a través de rutas moleculares que pueden generar disociación (Pei et al., 2023).

La reanudación meiótica requiere principalmente el cierre de las uniones gap entre el cumulo y el ovocito mediante la fosforilación conexina 43 (Cx43), reduciendo el factor de AMPc inhibidor hacia el ovocito y activa el Factor promotor de la maduración (MPF)(Pei et al., 2023). Este proceso puede ocurrir con una activación parcial del ERK1/2, siendo esto suficiente para fosforilar Cx43 e iniciar el cierre de las uniones gap.

En el estudio realizado por Azari et al., (2021), siendo el primer estudio

que evaluó sistemáticamente el efecto del cultivo de células ampulares bovinas en la expresión génica de los COCs, produciendo (Pakniyat et al., 2025) un alza significativa del gen GDF9 en los COCs madurados ($p < 0.001$), acompañado una mayor tasa de maduración nuclear con respecto al grupo control ($p = 0.002$). El GDF9 es un factor secretado por el ovocito, siendo necesario para el desarrollo del ovocito y la prevención de la apoptosis de las células del cúmulo (Pakniyat et al., 2025).

En el presente estudio, la monocapa generó un microambiente paracrino que pudo haber estimulado de forma similar la expresión de GDF9 en los COC, promoviendo la maduración nuclear por una ruta relativamente independiente a la expansión del cúmulo.

A pesar de que GDF9 es indispensable para la viabilidad y la función del cúmulo, no es un factor predominante en la activación de la HAS2 y la expansión del cúmulo en bovinos y ovinos (Rouhollahi Varnosfaderani et al., 2013) evidenciaron en ovinos que la expansión del cúmulos y la expresión de HAS2 no fueron afectadas con tratamientos de GDF9 exógeno, a la vez (Morikawa et al., 2021) en ovocitos de porcinos no promovió la expansión del cúmulo, y $< 10\%$ de los ovocitos maduraron en MII en el grupo de GDF9 aislado. Estos estudios confirman que el GDF9 actúa principalmente en la maduración nuclear y la viabilidad del cúmulo, el cual encaja coherente en los resultados obtenidos en el presente estudio.

Las células epiteliales oviductales en monocapa mantienen la capacidad secretora del factor inhibidor de Leucemia (LIF) e IGF2 en desdiferenciación parcial de las células (Hosseiniabadi et al., 2025). Pei et al., (2023) demostraron que la presencia de LIF mejora la maduración nuclear, función mitocondrial y niveles de genes antiapoptóticos en los ovocitos.

En investigaciones donde manejan el uso de células oviductales para la maduración de ovocitos en caninos obteniendo diferencias significativas entre control y cultivo de células del oviducto en la reducción de ovocitos en etapa de vesícula germinal y las tasas de metafase II más altas en cultivo de células oviductales (No et al., 2018).

Lee et al., (2017) manifiesta que el cultivo de células oviductales en fase de estro en caninas vivas, promovió tanto la reanudación y progresión de la meiosis en los ovocitos. En este estudio analizaron tres etapas del proceso de maduración de los ovocitos, obteniendo disminución de ovocitos en etapa vesícula germinal con un 32.5%, aumento en metafase I (46.7%) y ovocitos listos para la

fecundación en Meiosis-II (10.0%), lo que sugiere de igual manera que el estado fisiológico y etapa del ciclo estral pueden obtener mayor cantidad de ovocitos maduros.

CONCLUSIONES

Esta investigación buscaba evaluar el efecto en la maduración invitro de ovocitos bovinos con presencia de células oviductales, evidenciado valores estadísticamente significativos ($\chi^2 = 8.00$; gl = 3: p-valor = 0.046) en la expansión del cúmulo presentado mayor grado de expansión en el tratamiento control con grados entre 3 y 4, sin embargo, el tratamiento con células del oviducto evidencio diferencias numéricas en maduración nuclear, pero sin diferencias estadísticamente significativa. Estos hallazgos sugieren que la expansión del cúmulo no necesariamente se asocia de forma directa en la maduración de ovocito y que el microambiente de las células oviductales podría favorecer la competencia ovocitaria en la parte funcional.

Si bien el sistema de cultivo con células del oviducto mostro numéricamente mayor número de ovocitos maduros, es necesario a futuro desarrollar investigaciones donde tenga mayor control de las variables biológicas, condiciones fisiológicas de los materiales biológicos usados y experimentar la estimulación hormonal durante el cultivo celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Almiñana, C., Tsikis, G., Labas, V., Uzbekov, R., da Silveira, J. C., Bauersachs, S., & Mermillod, P. (2018). Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. *BMC Genomics* 2018 19:1, 19(1), 622-. <https://doi.org/10.1186/S12864-018-4982-5>
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? In *Molecular Human Reproduction* (Vol. 16, Number 12, pp. 896–906). <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>
- Azari, M., Kafi, M., Asaadi, A., Pakniat, Z., & Abouhamzeh, B. (2021). Bovine oocyte developmental competence and gene expression following co-culturing with ampullary cells: An experimental study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 19(4), 371. <https://doi.org/10.18502/IJRM.V19I4.9063>
- Bastos, N. M., Ferst, J. G., Goulart, R. S., & da Silveira, J. C. (2022). The role of the oviduct and extracellular vesicles during early embryo development in bovine. *Animal Reproduction*, 19(1). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0015>
- Bastos, N. M., Goulart, R. S., Bridi, A., Mazzarella, R., Alves, L., Da Silva Rosa, P. M., Strefezzi, R. D. F., Paskoski, L. B., Nociti, R. P., Sangalli, J. R., Saldanha, S. F., De Souza, C. A., Dos Santos, A. C., Chiaratti, M. R., Pugliesi, G., Meirelles, F. V., Perecin, F., & Da Silveira, J. C. (2025). The bovine oviductal environment and composition are negatively affected by elevated body energy reserves. *PLOS ONE*, 20(6), e0326138. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0326138>
- Cantanhêde, L. F., Santos-Silva, C. T., Moura, M. T., Ferreira-Silva, J. C.,

- Oliveira, J. M. B., Gonçalves, D. N. A., Teixeira, Á. A. C., Wanderley-Teixeira, V., & Oliveira, M. A. L. (2021). Follicle-stimulating hormone mediates the consumption of serum-derived glycogen by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Veterinary World*, 14(9), 2512. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2021.2512-2517>
- Cerny, K. L., Garrett, E., Walton, A. J., Anderson, L. H., & Bridges, P. J. (2015). A transcriptomal analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus the luteal phase of the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S12958-015-0077-1>
- Demetrio, D., Demetrio, C., Oliveira, M., Reis, R., & Santos, R. (2022). From oocyte to calf: practical aspects of bovine in vitro embryo production. *Clinical Theriogenology*, 14(3), 193–201. <https://doi.org/10.58292/CT.V14.9671>
- Fernández-Montoro, A., Angel-Velez, D., Benedetti, C., Azari-Dolatabad, N., Pascottini, O. B., Van Soom, A., & Pavani, K. C. (2023). Alternative Culture Systems for Bovine Oocyte In Vitro Maturation: Liquid Marbles and Differentially Shaped 96-Well Plates. *Animals*, 13(10), 1635. <https://doi.org/10.3390/ANI13101635/S1>
- Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K., & Krisher, R. L. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15(2), 395–401. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/15.2.395>
- Gilchrist, R. B., & Smitz, J. (2023). Oocyte in vitro maturation: physiological basis and application to clinical practice. *Fertility and Sterility*, 119(4), 524–539. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2023.02.010>
- Giller, K., Schmid, D., Serbetci, I., Meleán, M., Greve, S., von Meyenn, F.,

- Bollwein, H., & Herrera, C. (2025). In Vitro Maturation of Bovine Oocytes in the Presence of Resveratrol and Ellagic Acid but Not Chlorogenic Acid Modulates Blastocyst Antioxidant Gene Expression Without Impacting Embryo Development and Oxygen Consumption. *Antioxidants* 2025, Vol. 14, Page 621, 14(6), 621. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX14060621>
- Gilula, N. B., Epstein, M. L., & Beers, W. H. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *The Journal of Cell Biology*, 78(1), 58–75. <https://doi.org/10.1083/JCB.78.1.58>
- Herrera, C. A. M., Santos, D. K. C., Neira, P. A. M., & Zambrano, J. C. L. (2024). Maduración in vitro de ovocitos, análisis y perspectivas en la reproducción animal. *Dominio de Las Ciencias*, 10(1), 1221–1237. <https://doi.org/10.23857/dc.v10i1.3771>
- Hosseiniabadi, S. K., Nazari, H., Arabi, M., Shams Esfandabadi, N., Ahmadi, E., Afzali, A., & Ghanaei, H. (2025). Improving Bovine Embryo Development and Quality Using Bovine Oviductal Epithelial Cell-Derived Conditioned Medium (bOEC-CM). *Veterinary Medicine and Science*, 11(3). <https://doi.org/10.1002/vms3.70179>
- Ishikawa, S., Machida, R., Hiraga, K., Hiradate, Y., Suda, Y., & Tanemura, K. (2014). Hanging Drop Monoculture for Selection of Optimal Antioxidants During In Vitro Maturation of Porcine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), e26–e30. <https://doi.org/10.1111/RDA.12289>;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Kussano, N. R., Franco, M. M., & Nunes Dode, M. A. (2024). Biochemical profiling of the follicular environment to predict oocyte competence in cattle. *PLOS ONE*, 19(3), e0298316. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0298316>
- Lee, S. H., Oh, H. J., Kim, M. J., Kim, G. A., Choi, Y. Bin, Jo, Y. K., Setyawan,

- E. M. N., & Lee, B. C. (2017). Oocyte maturation-related gene expression in the canine oviduct, cumulus cells, and oocytes and effect of co-culture with oviduct cells on in vitro maturation of oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(7), 929–938. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-0910-x>
- Leese, H. J., Tay, J. I., Reischl, J., & Downing, S. J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: Role of a neglected epithelium. *Reproduction*, 121(3), 339–346. <https://doi.org/10.1530/REP.0.1210339>
- Liu, H., Zhou, D., Liu, C., Zhuan, Q., Luo, Y., Mo, X., Fu, X., & Hou, Y. (2021). The Calcium-Sensing Receptor Is Involved in Follicle-Stimulating Hormone-Induced Cumulus Expansion in in vitro Cultured Porcine Cumulus-Oocyte Complexes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 625036. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.625036/TEXT>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2008). In vitro-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology*, 69(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., & Boland, M. P. (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 38(4), 259–267. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0531.2003.00437.X>
- Lopera-Vásquez, R., Uribe-García, F., & Rondón-Barragán, I. (2022). Effect of estrous cycle phases on gene expression in bovine oviduct epithelial cells. *Veterinary World*, 15(7), 1665–1675. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2022.1665-1675>
- Mahmoud, M., A Y Khalil, A. A., Abdelhalim, B. R., M Abdelgawad, E. M., & Abdelaziz, R. L. (2025). In-vitro Maturation of Bovine Oocytes and Recent

Innovations by Harnessing the Power of Diverse Antioxidants. *J Vet Med Res.* <https://doi.org/10.21608/jvmr.2025.380595.1124>

Maillo, V., Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizo, D. (2016). Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. In *Theriogenology* (Vol. 86, Number 1, pp. 443–450). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.060>

Mastorocco, A., Cacopardo, L., Martino, N. A., Fanelli, D., Camillo, F., Ciani, E., Roelen, B. A. J., Ahluwalia, A., & Dell'Aquila, M. E. (2020). One-step automated bioprinting-based method for cumulus-oocyte complex microencapsulation for 3D in vitro maturation. *PLOS ONE*, 15(9), e0238812. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0238812>

Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M., & Eppig, J. J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* (New York, N.Y.), 296(5576), 2178–2180. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1071965>

McGlade, E. A., Mao, J., Stephens, K. K., Marquardt, R. M., Arguc, F. N., Lais, P. F., Wu, S. P., Winuthayanon, S., Shirwan, H., Yolcu, E. S., Hunter, M. I., Pru, J. K., Lydon, J. P., DeMayo, F. J., & Winuthayanon, W. (2025). Progesterone signaling in oviductal epithelial cells modulates the immune response to support preimplantation embryonic development. *Science Advances*, 11(16). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADT6113;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>

Mokhtar, D. (2015). Microscopic and histochemical characterization of the bovine uterine tube during the follicular and luteal phases of estrous cycle. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3(1), 44.

<https://doi.org/10.1016/j.jmau.2014.09.002>

Morikawa, R., Lee, J., & Miyano, T. (2021). Effects of oocyte-derived growth factors on the growth of porcine oocytes and oocyte–cumulus cell complexes in vitro. *The Journal of Reproduction and Development*, 67(4), 273. <https://doi.org/10.1262/JRD.2021-026>

No, J., Zhao, M., Lee, S., Ock, S. A., Nam, Y., & Hur, T. Y. (2018). Enhanced in vitro maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*, 105, 66–74. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.09.002>

Pakniyat, Z., Azari, M., Kafi, M., Ghaemi, M., Hashemipour, S. M. A., Safaie, A., & Eshghi, D. (2025). The effect of follicular and ampullary fluid extracellular vesicles on bovine oocyte competence and in vitro fertilization rates. *PLOS ONE*, 20(6), e0325268. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0325268>

Park, J. E., Kim, M. S., Lee, E., & Lee, S. T. (2021). In vitro maturation using an agarose matrix with incorporated extracellular matrix proteins improves porcine oocyte developmental competence by enhancing cytoplasmic maturation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(10), 807–817. <https://doi.org/10.1002/TERM.3228;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:19327005;W GROUP:STRING:PUBLICATION>

Pei, Z., Deng, K., Xu, C., & Zhang, S. (2023). The molecular regulatory mechanisms of meiotic arrest and resumption in Oocyte development and maturation. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12958-023-01143-0>

Pranomphon, T., Mahé, C., Demattei, M.-V., Papillier, P., Carvalho, A. V.,

- Reynaud, K., Almiñana, C., Bauersachs, S., Parnpai, R., Mermillod, P., Carvalho, V., & Saint-Dizier, M. (2024). Characterization of oviduct epithelial spheroids for the study of embryo-maternal communication in cattle. *Theriogenology*, 217, 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.01.022>
- Rakha, S. I., Elmetwally, M. A., El-Sheikh Ali, H., Balboula, A., Mahmoud, A. M., & Zaabel, S. M. (2022). Importance of Antioxidant Supplementation during In Vitro Maturation of Mammalian Oocytes. *Veterinary Sciences* 2022, Vol. 9, Page 439, 9(8), 439. <https://doi.org/10.3390/VETSCI9080439>
- Rizos, D., Maillo, V., & Lonergan, P. (2016). Role of the oviduct and oviduct-derived products in ruminant embryo development. *Animal Reproduction*, 13(3), 160–167. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR863>
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–248. <https://doi.org/10.1002/MRD.1153>
- Rouhollahi Varnosfaderani, S., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, S. M., Asadi Khashouei, E., Abbasi, H., Hosseinnia, P., & Nasr-Esfahani, M. H. (2013). Importance of the GDF9 signaling pathway on cumulus cell expansion and oocyte competency in sheep. *Theriogenology*, 80(5), 470–478. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.05.009>
- Saint-Dizier, M., Souza-Fabjan, J. M. G., Reynaud, K., Mermillod, P., Almiñana, C., Bauersachs, S., & Mahé, C. (2025). Oviduct epithelium interactions: roles in sperm selection and embryo quality. *Animal Reproduction*, 22(3). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2025-0035>
- Salustri, A., Garlanda, C., Hirsch, E., De Acetis, M., Maccagno, A., Bottazi, B.,

- Doni, A., Bastone, A., Mantovani, G., Peccoz, P. B., Salvatori, G., Mahoney, D. J., Day, A. J., Siracusa, G., Romani, L., & Mantovani, A. (2004). PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development*, 131(7), 1577–1586. <https://doi.org/10.1242/DEV.01056>
- Schmaltz-Panneau, B., Cordova, A., Dhorne-Pollet, S., Hennequet-Antier, C., Uzbekova, S., Martinot, E., Doret, S., Martin, P., Mermillod, P., & Locatelli, Y. (2014). Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture. *Animal Reproduction Science*, 149(3–4), 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.022>
- Schoenfelder, M., & Einspanier, R. (2003). Expression of Hyaluronan Synthases and Corresponding Hyaluronan Receptors Is Differentially Regulated During Oocyte Maturation in Cattle. *Biology of Reproduction*, 69(1), 269–277. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.102.011577>
- Senn, L. K., Peterson, K. D., Edwards, J. L., Payton, R. R., & Mathew, D. J. (2024). Oviduct and endometrial epithelium improve in vitro produced bovine embryo developmental kinetics. *Reproduction (Cambridge, England)*, 167(5), e240008. <https://doi.org/10.1530/REP-24-0008>
- Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E., & Paul, D. L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997 385:6616, 385(6616), 525–529. <https://doi.org/10.1038/385525a0>
- Singina, G. N., & Shedova, E. N. (2019). Final maturation of bovine oocytes in a fert-talp medium increased their quality and competence to in vitro embryo development. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 54(6), 1206–1213. <https://doi.org/10.15389/AGROBIOLOGY.2019.6.1206RUS>
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126–136.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>

Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., & De Kruif, A. (2002).

Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 61(3), 414–424. <https://doi.org/10.1002/MRD.10102>

Ulbrich, S. E., Kettler, A., & Einspanier, R. (2003). Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor β and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84(2–3), 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00039-6)

Walter, I. (1995). Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *The Anatomical Record*, 243(3), 347–356. <https://doi.org/10.1002/AR.1092430309>

Wang, C. K., Robinson, R. S., Flint, A. P. F., & Mann, G. E. (2007). Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. *Reproduction*, 134(2), 365–371. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0133>

Yokoo, M., Kimura, N., & Sato, E. (2010). Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *The Journal of Reproduction and Development*, 56(1), 15–19. <https://doi.org/10.1262/JRD.09-173E>

Zhang, Y.R., & Xu, D. J. (2025). Mitochondrial Quality Control in Bovine Oocyte Maturation: Mechanics, Challenges, and Prospects for Enhancing Reproductive Efficiency. *Animals: An Open Access Journal from MDP1*, 15(13), 2000. <https://doi.org/10.3390/ANI15132000>

Zhao, H., Ge, J., Wei, J., Liu, J., Liu, C., Ma, C., Zhao, X., Wei, Q., & Ma, B. (2020). Effect of FSH on E2/GPR30-mediated mouse oocyte maturation in vitro. *Cellular Signalling*, 66, 109464.



Yo, **Kelly Yajaira Mora Rojas** portadora de la cédula de ciudadanía N.º **0302995519**. En calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Maduración in-vitro de ovocitos bovinos en cultivo de células oviductales”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **09 de julio de 2026**

F: 

Kelly Yajaira Mora Rojas

C.I. 0302995519