



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**ESTIMULACION OVARICA EN OVEJAS CON LA APLICACIÓN DE
FSH-p EPIDURAL EN LA PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES**

PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL

TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO

AUTOR: PACHECO PACHECO CARLOS JULIO

DIRECTOR: ING. ALVARADO ALVARADO JUAN CARLOS, MSc.

CUENCA – ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

ESTIMACIÓN OVARICA EN OVEJAS CON LA APLICACIÓN DE FSH-p
EPIDURAL EN LA PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO**

AUTOR: PACHECO PACHECO CARLOS JULIO

DIRECTOR: ING. ALVARADO ALVRADO JUAN CARLOS, MSc.

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

**Estimación ovárica en ovejas con la aplicación de FSH-p epidural en la producción in vitro de
embriones**

Carlos Julio Pacheco Pacheco

Universidad Católica de Cuenca

Unidad de titulación

Ing. Juan Carlos Alvarado Alvarado

30 de noviembre de 2023

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Carlos Julio Pacheco Pacheco portador de la cédula de ciudadanía N 0104287040. Declaro ser el autor de la obra: "Estimulación Ovárica en Ovejas con la Aplicación de FSH-p Epidural en la Producción in vitro de Embriones", 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, 01 de diciembre de 2023

F: 
.....
Carlos Julio Pacheco Pacheco


C.I. 0104287040

CERTIFICACIÓN

Yo, **Juan Carlos Alvarado Alvarado Alvarado**, certifico que el artículo titulado “Estimulación ovárica en ovejas con la aplicación de FSH-p epidural en la producción in vitro de embriones”, fue desarrollado por **Carlos Julio Pacheco Pacheco**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas establecidas por la Universidad Católica de Cuenca.

Debido que es una investigación particular con el propósito de cumplir un requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario.

Cuenca, noviembre de 2023



ING. Juan Carlos Alvarado Alvarado, MSc.

Tutor

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

DEDICATORIA

En primer lugar, dedico este trabajo a mi padre, el Sr. Eduardo Pacheco F., por la inquebrantable confianza, apoyo incondicional y la continua motivación que me brinda cada día. A lo largo de mi vida, he cometido errores, incluso en dos etapas distintas de mi camino, pero a pesar de ello, su amor nunca ha menguado. Siempre ha demostrado que su deseo más sincero es mi bienestar y, ante todo, verme convertido en un profesional exitoso. Sus palabras y acciones han sido una fuente inagotable de inspiración para mí. Gracias por ser el mejor padre que alguien podría desear.

En segundo lugar, doy gracias a mis hermanos Fabián, Marco y Daniel, familiares y amigos, por su apoyo inquebrantable, aliento constante y enseñanzas a lo largo de este viaje académico. Sus palabras (algunos insultos) en los momentos de desafío me han recordado la importancia de la perseverancia y la dedicación.

Esta investigación es un testimonio de mi viaje de rehabilitación, por lo cual lo dedico a Narcóticos Anónimos, FREEDOM por las herramientas que me ha brindado para la sobriedad y, sobre todo, la esperanza de un futuro mejor mediante la transformación de mi vida. Estoy agradecido por la oportunidad de compartir mi gratitud y reconocimiento hacia esta comunidad y hacia Nahúm Cabrera en estas páginas.

Y para terminar, a Dios, fuente de fortaleza, sabiduría y guía a lo largo de este arduo camino académico. Su gracia y bendiciones han sido mi fuente de sustento en los momentos de desafío en cada etapa de la universidad. Sus bendiciones, su amor eterno, han sido la guía principal para culminar esta etapa de mi vida.

Carlos Julio Pacheco P.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar los efectos de la estimulación ovárica para la recuperación de ovocitos mediante la técnica de aspiración folicular OPU (Ovum Pick-Up) con la administración epidural de FSH-p en comparación con la combinación de FSH-p y eCG administrado por vía intramuscular en la producción *in vitro* de embriones. Para ello se utilizaron tres tratamientos; T1: 100mg de FSH-p por vía epidural divididas en dos dosis (7:00am-18:00pm), combinado con 300UI de eCG intramuscular (IM). T2: 100mg de FSH-p (IM) divididas en dos dosis (7:00am-18:00pm), más 300UI de eCG (IM). T3: 300UI de eCG intramuscular. Las variables a medir fueron: Expansión de células del cúmulo, porcentaje de maduración, porcentaje de fecundación y producción de embriones. Los resultados de ovocitos recuperados en el T1: 33; T2: 38; T3: 20 (p: 0.209). La clasificación de ovocitos por grados estableció el porcentaje mas alto del T1: 25.8%, seguido del T2: 19.3% y del T3: 13.7% (p: 0.323), los tres en el grado I. La expansión (escala 1-4) fue similar entre el T1 y el T2 con 3.25 (p: 0.667). Los promedios de la maduración fue: T1-47.92%, T2-66.07% y T3-70.01% (p: 0.615). El resultado obtenido en la medición del clivaje presentó los siguientes porcentajes T1: 50%, T2: 22% y T3: 66.7%. En la producción de embriones *in vitro* el T1 y T2 alcanzaron la fase de mórula. Como resultado, no existieron diferencias entre tratamientos.

Palabras clave: Ovocitos, epidural, *in vitro*, maduración, embriones

ABSTRACT

This research aimed to assess the effects of ovarian stimulation for oocyte recovery using the Ovum Pick-Up (OPU) follicular aspiration technique with epidural administration of FSH-p compared to the combination of FSH-p and eCG administered intramuscularly *in vitro* embryo production. These three treatments were used: T1: 100mg of FSH-p epidurally divided into two doses (7:00 am-6:00 pm), combined with 300IU of eCG intramuscularly (IM). T2: 100mg of FSH-p (IM) divided into two doses (7:00 am-6:00 pm) plus 300IU of eCG (IM). T3: 300IU of eCG intramuscularly. The variables measured were: Cumulus cell expansion, maturation percentage, fertilization percentage, and embryo production. Oocyte recovery results were T1: 33, T2: 38, and T3: 20 (p: 0.209). Oocyte classification by grade established the highest percentage in T1: 25.8%, T2: 19.3%, and T3: 13.7% (p: 0.323), all in grade I. Expansion (scale 1-4) was similar between T1 and T2 with 3.25 (p: 0.667). Maturation averages were T1 at 47.92%, T2 at 66.07%, and T3 at 70.01% (p: 0.615). The cleavage measurement results showed the following percentages T1: 50%, T2: 22%, and T3: 66.7%. In *in vitro* embryo production, T1 and T2 reached the morula stage. As a result, there were no differences between treatments, so testing different protocols and routes of FSH-p administration in further research is recommended.

Keywords: Oocytes, epidural, *in vitro*, maturation, embryos

Introducción

La producción de ovejas en Ecuador ha desempeñado un papel fundamental al proporcionar una fuente de sustento y recursos económicos para diversas familias e instituciones. A lo largo de los años, la crianza de ovejas ha tenido un impacto positivo en la sociedad ecuatoriana al generar una variedad de productos valiosos. Dentro de estos productos se destaca la carne y la lana, ambos reconocidos por su alta calidad. Estos recursos no solo han contribuido al bienestar económico de quienes se dedican a la ganadería ovina, sino que también han aportado beneficios a la sociedad en general (Galora., 2006).

Las especies que han experimentado el mayor aumento en su población hasta el año 2019 son las ovinas y caprinas, con un crecimiento del 30.6% cada una en comparación con el año 2018. La cría de ganado ovino se encuentra principalmente concentrada en las provincias de la Región Sierra, representando aproximadamente un 95% de la distribución, mientras que en un 4% se encuentra en la Costa y únicamente un 1% en la región de la Amazonia (INEC & ESPAC, 2019).

En el ámbito de la cría de ovinos, se presentan diversos desafíos en el proceso de reproducción. Entre estos desafíos se encuentran los bajos índices de fertilidad, una duración prolongada del periodo sin concepción, dificultades en la identificación de los momentos de celo, y se ha observado una deficiencia en el correcto uso de biotecnologías reproductivas. Estos problemas han conducido a pérdidas económicas significativas en la producción, lo que a su vez ha resultado en una carencia de enfoque técnico en sanidad, manejo y reproducción. (Feijo et al., 2018).

Debido a su manejo relativamente sencillo, el ganado ovino ha sido elegido como un modelo para investigar y desarrollar diversas biotecnologías reproductivas en el ámbito de los rumiantes, estos pequeños rumiantes se presentan como un modelo excepcional para la implementación de estas técnicas avanzadas. De hecho, esta es una de las razones fundamentales por las cuales la oveja fue el primer animal doméstico en ser clonado (Ugalde et al., 2020). A pesar de que las biotecnologías reproductivas tuvieron sus primeros desarrollos en pequeños rumiantes, no han sido explotadas comercialmente en ovejas con la misma amplitud que en especies de mayor tamaño, siendo los bovinos la principal especie beneficiaria de estas aplicaciones avanzadas (Gonzales K. , 2017).

Existen diversos métodos para obtener ovocitos en el proceso de producción *in vitro* de embriones, ya sea que provengan de animales vivos o de ovarios de animales sacrificados en mataderos. En el caso de animales vivos, el método más común para recuperar ovocitos es la aspiración folicular guiada por ultrasonografía. Por otro lado, en el caso de los ovarios provenientes de mataderos, los ovocitos pueden ser adquiridos mediante aspiración folicular utilizando una jeringa, a través de seccionamiento ovárico, o haciendo uso de una bomba de vacío empleada en la técnica de OPU (Ovum Pick-Up) (Baldassarre, 2007).

El objetivo de cualquier método de obtención de ovocitos es garantizar la máxima cantidad de células germinales femeninas viables para los procesos subsiguientes de maduración y fecundación *in vitro*. Sin embargo, diversos factores inciden en la calidad durante su recuperación, siendo una de ellos la presión de vacío empleada en dicho proceso. Esta presión no solo influye en la cantidad de células obtenidas. Sino que también desempeña un papel crucial

en su calidad y, por ende, en su capacidad intrínseca para someterse a un proceso de maduración exitosa y desarrollarse de manera competente hasta alcanzar el estadio de blastocito en el contexto de FIV (Mocha y Quesada., 2017). Por consiguiente, la continuación de las investigaciones en el desarrollo y perfeccionamiento de estas biotecnologías reproductivas es fundamental para garantizar su aplicación apropiada. (Galora, 2006).

La maduración de los ovocitos comprenden dos procesos principales: la maduración nuclear, que involucra la condensación del material nuclear mediante dos ciclos, y la maduración del citoplasma, que abarca la redistribución de los organelos y el desarrollo del citoplasma. Sin embargo, la formación limitada de blastocitos está relacionada con una maduración anómala del citoplasma en los ovocitos, incluso en presencia de una maduración nuclear completa (O'Brien, 1996). La maduración citoplasmática puede ser inducida *in vitro* mediante la adición de suero o fluido folicular, así como de hormona de crecimiento, factor de crecimiento epidérmico, inhibina y activina al medio de maduración. (Fernández Reyes et al., 2007).

El medio TCM-199 destaca como el más empleado en la maduración *in vitro* y el cultivo de embriones en la especie bovina. Este medio incorpora una amplia gama de aminoácidos, lípidos y vitaminas, contribuyendo así a su efectividad (Gadea & Gardón, 2003). Dentro de los componentes de este medio, se encuentra elementos como la hipoxantina, la glucosa y los fosfatos, los cuales desempeñan un papel crucial al bloquear o inhibir el desarrollo embrionario temprano en bovinos y hámsteres (Robledo et al., 2009).

Los ovocitos madurados pueden ser fertilizados mediante semen eyaculado o recogido de la cola del epidídimo, en su forma fresca o después de ser descongelado. En ambos escenarios, el aspecto determinante reside en la correcta selección y capacitación del semen que se empleará. Como resultado, antes de proceder con la fertilización en sí, es imperativo llevar a cabo la preparación adecuada del esperma (Cognié et al., 2003).

La fertilización es el proceso en el cual se fusionan dos células altamente especializadas, el ovocito y el espermatozoide, cada uno portador de una dotación cromosómica haploide (n). Durante este proceso, el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida y se une al ovocito, desencadenando interacciones y activaciones que dan origen a un cigoto con una dotación cromosómica diploide ($2n$). No obstante, los espermatozoides de los mamíferos no tienen la capacidad de fertilizar el ovocito de manera inmediata tras la eyaculación. Para adquirir esta capacidad, previa a la fertilización, los espermatozoides necesitan un periodo de incubación en el aparato reproductor de la hembra. Durante este intervalo, experimentan una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, que juntos constituyen el proceso de capacitación. (Accardo et al., 2004).

Bases Teóricas

Maduración *in vitro* de ovocitos de ovejas

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, es el proceso por el que un ovocito en estado de vesícula germinal realiza los cambios nucleares y citoplasmáticos necesarios para poder llegar a la expulsión del primer corpúsculo polar. La maduración de ovocitos depende mucho de los componentes de los medios y de igual manera de las condiciones utilizadas para esta técnica (Thompson, 2000).

La MIV es un proceso crucial en la producción de embriones, este proceso está influenciado por los componentes de los medios así como las condiciones utilizadas para esta técnica. Este es uno de los principales factores que limitan la eficiencia de la producción de embriones, ya que aún después de la selección cuidadosa de una población homogénea de complejos cúmulo-ovocito (COC), sólo la tercera parte, alcanzan la maduración citoplásmica completa y poseen la capacidad de producir blastocitos viables para su transferencia, lo que ocasiona que ésta técnica de reproducción asistida sea menos eficiente, comparada con la producción de embriones *in vivo* (De Wit et al., 2001).

La capacidad de los medios de cultivo utilizados durante la MIV para reproducir las complejas señales y comunicación entre los ovocitos y las células somáticas circundantes, que ocurren de manera natural dentro del folículo ovulatorio, afectan la tasa de fertilización y desarrollo embrionario (Cognié, 1999).

Los medios comerciales comúnmente utilizados para la MIV, tal como el TCM-199 suplementado con suero de origen animal, han obtenido resultados aceptables; sin embargo, para algunos autores, el uso de tales medios presenta algunos inconvenientes como una gestación prolongada y un mayor peso al nacimiento en ovinos, representando además, una potencial vía de introducción de agentes patógenos o toxinas (Thompson, 2000).

Hay que tener en cuenta que la maduración del ovocito en el folículo está condicionada por la presencia de hormonas: FSH, LH y estradiol (Sakaguchi et al., 2018). Por esta razón en la maduración *in vitro* se necesita que los medios de cultivo se parezcan lo más posible a las condiciones *in vivo* y por ello actualmente se enriquecen con dichas hormonas. Sin embargo, la adición de estas hormonas es todavía controvertida, ya que algunos estudios no encuentran diferencias significativas en los ovocitos que alcanzan la metafase II (MII) o la formación de blastocitos en presencia o ausencia de hormonas exógenas gonadotrópicas. Otro de los problemas que se han descrito durante la MII es el endurecimiento de la zona pelúcida produciendo una disminución en la tasa de fertilidad. Para evitar esto se añade al medio de maduración entre un 1 a 5% de suero fetal (Fernández Reyes et al., 2007).

Maduración del ovocito

El fenómeno de la maduración del ovocito es muy compleja, este proceso empieza desde el estadio de Profase de MI hasta llegar a MII (maduración nuclear). Siempre y cuando exista un pico ovulatorio de la hormona luteinizante (LH) el ovocito completará la meiosis, o también, cuando es retirado el folículo para empezar el proceso de la maduración *in vitro*. Para la maduración nuclear es necesario un tiempo de 24 horas. (Vargas Espin, 2018).

Maduración citoplasmática

Zarate., (2010), manifiesta que la maduración citoplasmática es muy importante ya que prepara al ovocito para resistir la fertilización y contribuir con los nutrientes requeridos para el desarrollo embrionario temprano. Durante la etapa de crecimiento, el ovocito experimenta una reorganización citoplasmática influenciada por la expresión genética, la multiplicación, modificación y redistribución de organelos, así como la alteración postranscripcional de los mARNs que se acumularán para su posterior utilización durante el inicio del proceso de clivaje embrionario (Tarazona et al., 2010).

En los años recientes, ha surgido el concepto de maduración citoplasmática, el cual ha posibilitado el aumento de la tasa de desarrollo embrionario en sus etapas iniciales y de la misma forma, se ha logrado optimizar las condiciones del cultivo *in vitro* mediante este enfoque (Carrasco, 2012). Este concepto se fundamenta en la premisa de que durante el proceso de maduración, una diversidad de acontecimientos tienen lugar en el citoplasma del ovocito, siendo necesarios para culminar la competencia ovocitaria antes de la fecundación (Krisher et al., 2007).

Los procesos que acontecen en el citoplasma y su vínculo con la competencia ovocitaria están aun envueltos en cierta opacidad. De hecho, existe una carencia de información coherente acerca de las transformaciones tanto estructurales como moleculares que experimentan los ovocitos durante su proceso de maduración (Ferreira et al., 2009).

En términos amplios, se ha llegado a un consenso en que el ARN mensajero y las moléculas proteicas producidas durante las etapas de crecimiento y maduración del ovocito desempeña un papel fundamental en el fomento del desarrollo embrionario temprano, previo a la activación genómica embrionaria (Lonergan et al., 2003).

Maduración Nuclear

La maduración nuclear abarca el periodo que se extiende desde el primer hasta el segundo arresto meiótico, implicando cambios cromosómicos de gran relevancia. Este proceso se inicia con la disolución de la envoltura nuclear, permitiendo así el progreso de la maduración hacia la generación del primer cuerpo polar y la posterior configuración de la segunda metafase, que se distingue por un segundo periodo de arresto meiótico. Esta situación perdura hasta que se lleva a cabo el proceso de fecundación (De los Reyes, 2011). En bovinos y ovinos, se requiere un tiempo de 24 horas para la maduración *in vitro* para obtener un porcentaje superior al 85% de ovocitos madurados en estadios de Metafase II (Van Den Hurk & Zhao., 2005)

Al comienzo del proceso de maduración, el núcleo del ovocito primario permanece estancado en la fase de profase, especialmente en el estadio de vesícula germinal. A continuación, el ovocito da inicio a la división meiótica, permitiendo que el núcleo entre en la diacinesis. Al finalizar la fase de profase I, se desintegra la envoltura nuclear y se rompe la vesícula germinal. Al mismo tiempo, los nucléolos desaparecen y los cromosomas experimentan una compactación que culmina en la creación del huso acromático en la metafase I. Posteriormente, ocurre la separación

de los cromosomas homólogos, lo que conduce a la expulsión del primer corpúsculo polar y a la formación del ovocito secundario, el cual contiene únicamente un par de cromosomas (Huanca et al., 2014).

La reacción de la meiosis ocurre después de la pubertad y se suele desencadenar en la mayoría de las especies por un aumento significativo de la hormona LH justo antes de la ovulación. Al llegar al final de la fase de crecimiento y previo al reinicio de la meiosis, el núcleo del ovocito exhibe un tamaño considerable y una coloración tenue y difusa al ser teñido con agentes como el Hoechst. Este estado nuclear se denomina comúnmente vesícula germinal, caracterizado por estas particularidades (Tarazona et al., 2010).

Cuando el ovocito ha alcanzado su tamaño, inicia la meiosis, un proceso que al completarse se denomina competencia meiótica (De Vantéry et al., 1997), y ocurre durante 3 etapas: 1. desintegro de la vesícula germinal, esta etapa comienza con la fosforilación de la lámina nuclear y la disolución del nucléolo, 2. Avance hasta la Metafase I y expulsión del primer cuerpo polar, y 3. Continuación a la metafase II de meiosis II para alcanzar el estado haploide en el momento del contacto entre el espermatozoide y el ovocito expulsando el segundo cuerpo polar (Sun & Nagai, 2003).

Conformación de la zona pelúcida

La investigación sobre la zona pelúcida (ZP) en ovocitos ovinos ha sido limitada hasta el momento. Esta matriz extracelular, envuelve tanto al ovocito como al embrión antes de su implantación, la ZP asegura el contacto específico entre las células espermáticas y la especie. En la mayoría de las especies, es el propio ovocito el que secreta la ZP (Cuadrado, 2012). Esta estructura se compone de tres o cuatro familias de glicoproteínas que forma una estructura tridimensional como resultado de familias de genes llamadas ZP1, ZPA, ZPC y ZPB, que codifican proteínas que se designan ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Blackmore et al., 2004)

Duración y condiciones de maduración-cultivo

De acuerdo con el estudio de Huanca et al., (2014), el proceso de maduración *in vitro* en especies afines, como la alpaca, abarca un intervalo de tiempo de 32 a 44 horas. Este lapso se ha determinado como óptimo para lograr un mayor rendimiento de ovocitos en el estadio de metafase II que han alcanzado plena madurez.

Las condiciones físicas óptimas para la maduración *in vitro* difieren entre dos enfoques. Uno de ellos utiliza 22.3 mg/ml de piruvato de sodio junto con el fluido folicular porcino y gonodotropinas (eCG Y Hcg). Sin embargo, su eficacia es inferior en comparación con la influencia positiva de los variados componentes del fluido folicular, como proteínas, carbohidratos, enzimas y hormonas. Este medio crea un ambiente más favorable para la maduración exitosa. La adecuación de las condiciones físicas es crucial, ya que deben asemejarse a la temperatura corporal de la cerda. La adicción del suplemento proteico de suero fetal bovino (SFB) en los medios de cultivo impacta notablemente el porcentaje de maduración, mejorando los resultados (De los Reyes, 2011).

Evaluación de cultivo *in vitro* de embriones

El proposito del medio en la Cultura *In Vitro* (CIV) es replicar las propiedades fisicoquimicas del fluido oviductual. El medio conocido como Fluido Oviductual Sintetico (SOF) se originó a partir del analisis bioquimico del liquido del oviducto ovino, al cual se le añaden aminoacidos y albúmina sérica bovina. Sin embargo, SOF no es el unico medio empleado; el Mdio de Cultivo de Tejidos 199 (TCM-199) tambien se emplea con este fin. Ambas formulas contienen componentes esenciales para el desarrollo embrionario, tales comoproteinas, sales inorgánicas, reguladores de pH (bicarbonato de sodio) y fuentes de energí (glucosa, lactato y piruvato) (Robledo et al., 2009).

La prueba para evaluar la viabilidad embrionaria es a base de tinciones como la de tinción diferencial fluorescente, está prueba consiste en exponer a los embriones a dos fluorocromos como son el Ioduro de Propidio (IP) y la Bis Bienzimida (Hoechst). En el caso de IP penetra solo las células que tienen daño en la membrana plasmática marcando en color rojo; el Hoechst tiñe toda las células embrionarias en color azul independientemente si tienen daño o no. De está manera se puede contabilizar el número total de células que tiene el embrión y cuantas de ellas se dañaron por el proceso de cultivo y de criopreservación si son congelados (Tamay & Velez, 2018).

Materiales y Métodos

Ubicación

La presente investigación se realizó en la Granja de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, ubicada en la parroquia Machángara, cantón Cuenca, provincia del Azuay, con una temperatura promedio anual de 11.8°C, precipitación de 512 mm al año y una altitud de 2560 msnm. Coordenadas: 2°52'55" S 78°57'31"W.

Diseño experimental

La investigación fue experimental descriptiva, se llevó a cabo tres tratamientos a 12 ovejas Pelibuey: cuatro ovejas por grupo experimental, dos repeticiones por oveja, de uno a tres partos y con condiciones corporal entre 2.5 y 3.5, todas fueron sometidas a un protocolo de estimulación ovárica.

Variables

Variable Independiente: T1: FSH-p via epidural, T2 FSH-p IM, T3 Ecg IM

Variable dependiente:

Expansión de células de cumulos

Maduración

Porcentaje de fecundacion

Produccion de embriones

Operacionalidad de las variables

En la tabla 1 se presenta la Operacionalidad de las variables dependientes

Tabla 1. Operacionalidad

Variable dependiente	Medición
Expansión de células de cúmulo	Escala de 1-4
Maduración	Presencia de corpúsculo polar (Tinción de HOECHST)
Porcentaje de fecundación	Porcentaje de ovocitos divididos (48h post inseminación)
Producción de embriones	Porcentaje de embriones

Tratamientos

En la figura 1, 2 y 3 se presenta detalladamente los pasos de cada tratamiento con los cuales se trabajó en los diferentes grupos de ovinos.

Figura 1. Procedimiento del Tratamiento 1 (T1)

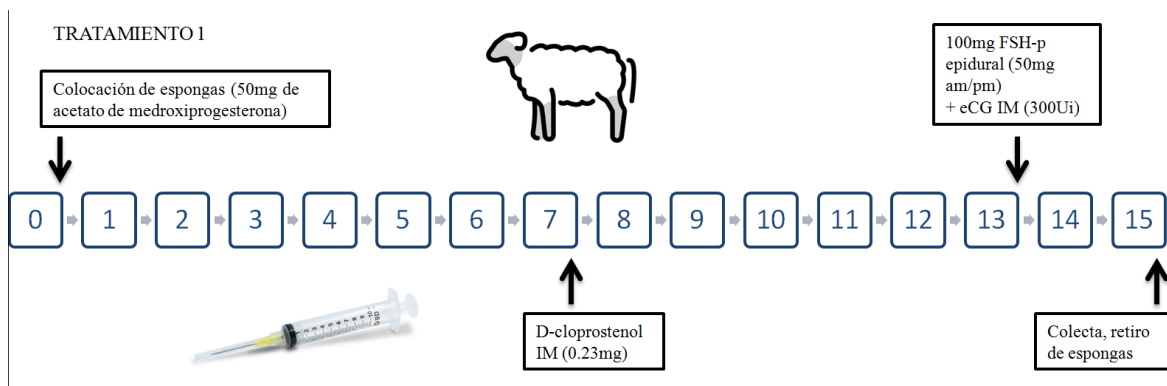


Figura 2. Aplicación del Tratamiento 2 (T2)

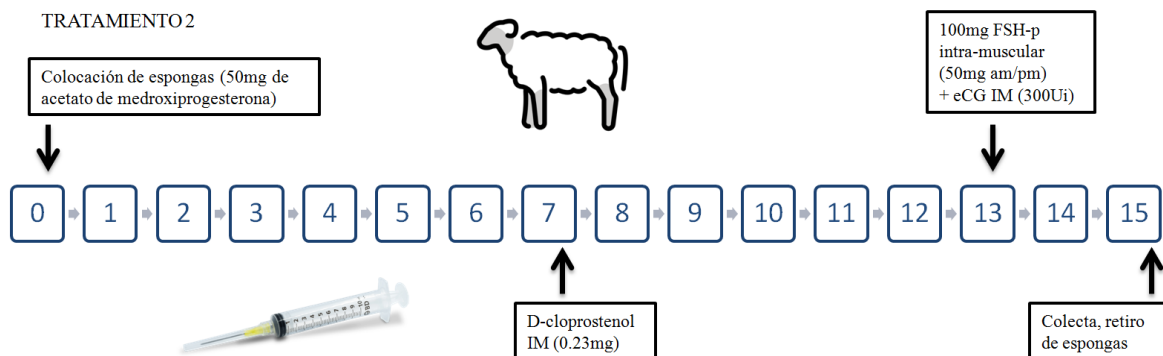
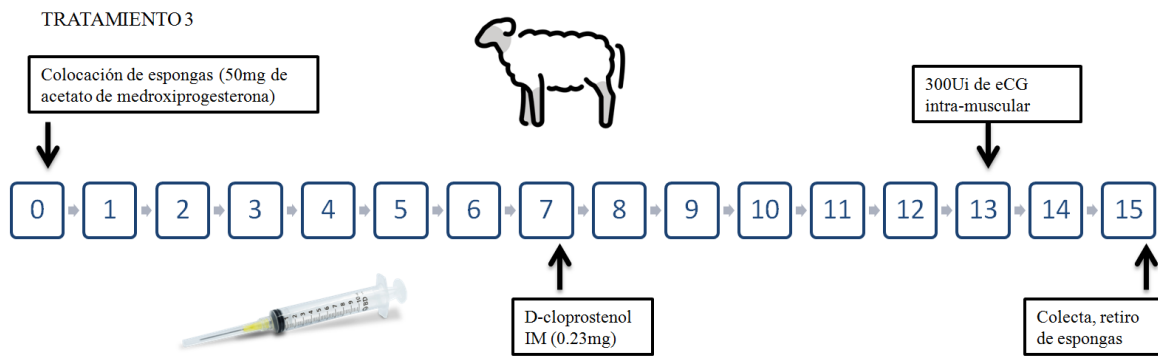


Figura 3. Proceso del Tratamiento 3 (T3)



Aspiración Folicular

Una vez obtenidos los ovocitos de cada tratamiento se pre-seleccionó y se agrupó, luego se colocaron en un medio con Lactato de Ringer con el 0.1% de Alcohol Polivinílico (PVA) mas 50UI de Heparina /ml y mas 50µgr /ml de Amikacina.

Clasificación de ovocitos

Se clasificó según La Sociedad Internacional de Tecnología de embriones (IETS), de acuerdo a la morfología de sus estructuras, donde se considera como: grado I, gran potencia de desarrollo embrionario, con 4 o mas capas del células de cumulus unidas a la zona pelúcida; grado II, con 3-5 capas de células del cumulus, con citoplasma granulado y oscuro; grado III, desnudos, con 1-2 capas de células del cumulus, citoplasma granulado irregular y vacuolado y grado IV, aquellos ovocitos desnudos con citoplasma heterogéneo.

Maduración de ovocitos

Una vez clasificados los ovocitos fueron seleccionados los de grado 1 y 2; y puestos en un medio de maduración TCM-199 mas 10% de Suero Fetal Bovino, 10µg/ml de FSH-p, 10UI/ml de rhCG y mas 50µg/ml de Amikacina, y estos a su vez en una incubadora con un ambiente de 5% CO₂, temperatura de 38.5 °C y humedad a saturación durante 24h.

Expansión del cúmulus

A las 24 horas de colocados en el medio de maduración se observó la expansión de las células de cúmulus de los ovocitos, se clasificó en una escala del 1 al 4.

Evaluación de Maduración

Se procedió a denudar los ovocitos de cada tratamiento, para dejarlos sin células del cúmulus. Posterior a ello se sometieron a una tinción de HOECHST, lo que nos permitió observar la maduración de los ovocitos por la presencia de corpúsculo polar.

Fertilización de ovocitos

Después del periodo de incubación, los ovocitos fueron trasladados al medio de fecundación (TALP-FIV), enriquecido con 20 µg/mL de heparina, al que se incorporaron en una relación de un millón de espermatozoides por ml. Estos espermatozoides fueron previamente seleccionados mediante un proceso de doble centrifugación en medio TALP sin heparina, y luego se incubaron durante 18-24 horas en un entorno con un 5% de CO₂, a una temperatura de 38.5 °C y con una humedad óptima.

Cultivo de embriones

Los potenciales cigotos fueron completamente desnudados mediante el uso de una pipeta en un medio denominado H-SOF. Posteriormente, se trasladaron a un entorno de cultivo conocido como SOFcitrato, al cual se le añadió un 5% de suero fetal bovino (SFB). Estos cigotos desnudados fueron incubados a una temperatura de 38.5 °C durante un periodo de 5 días en una incubadora trigas en un ambiente de 5% de CO₂, 5% de O₂ y un 90% de N₂, manteniendo una humedad óptima. Luego de 48 horas desde la fecundación *in vitro* (FIV), se procedió a evaluar el proceso de clivaje, 6 días después de la FIV, se evaluó la producción de embriones resultantes. Estos embriones fueron clasificados siguiendo los estándares establecidos por la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS), y su cantidad de mórulas y blastocitos fue registrada de acuerdo a dichos criterios.

Diseño estadístico

Para el análisis de la variabilidad entre tratamientos se optó por comparar los datos con la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis ($p \leq 0,05$) para determinar diferencias entre Grados de Maduración, y número de ovocitos. Posteriormente los casos de expansión, maduración y clivaje fueron analizados por estadística descriptiva, la cual permitió la correcta valoración de los mismos.

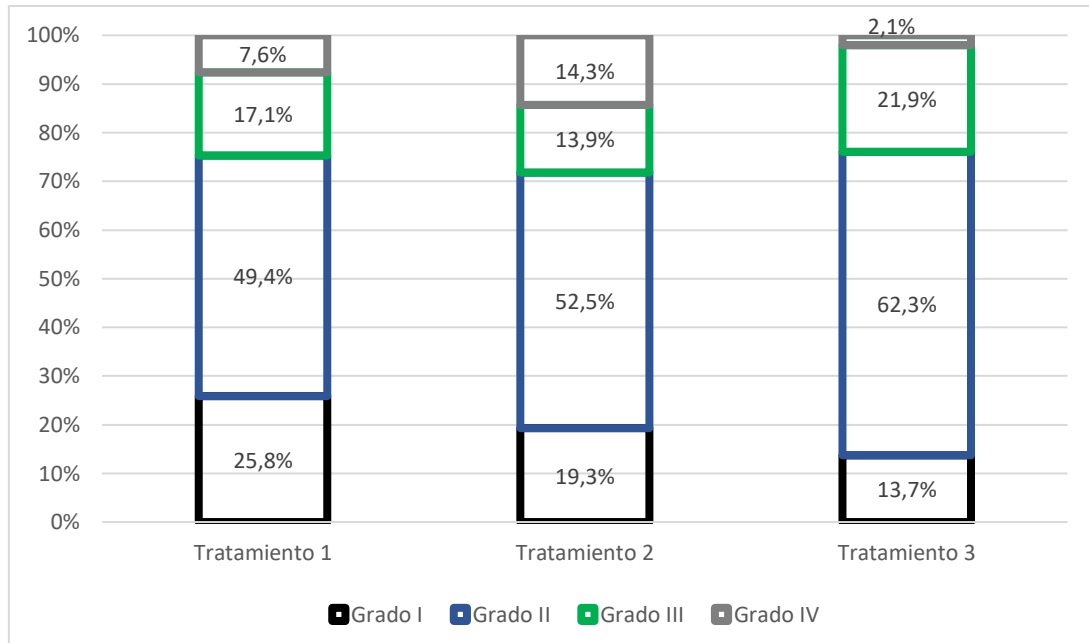
Resultados y Discusión

Tabla 1. Tabla de ovocitos recuperados

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Valor p
N	4	4	4	
Total	33	38	20	
Promedio	8,25	9,5	5	0,209

Según el análisis no paramétrico de Kruskal y Wallis, se observó que en el Tratamiento 1 se registraron un total de 33 ovocitos, con un promedio de 8.25, en el Tratamiento 2, se contabilizaron 38 ovocitos, con un promedio de 9.5, mientras que el Tratamiento 3 mostró un total de 20 ovocitos, con un promedio de 5. Sin embargo, sin diferencia estadística ($p=0.209$)

Figura 4. Clasificación por los grados



En la Figura 4, se presenta un análisis de la clasificación de ovocitos por grados, revelando que el Tratamiento 3 ostenta el porcentaje más bajo (13.7%) en el grado I, seguido por el Tratamiento 2 con un 19.3% y finalmente, el Tratamiento 1 exhibe el porcentaje más alto (25.8%). No obstante, en los tres tratamientos, no se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.323$).

En la aplicación del tratamiento 1, se logró recuperar un total de 33 ovocitos, con un promedio de 8,25. Este promedio fue superado por 1.20 por el Tratamiento 2 ($n = 38$ ovocitos; Promedio: 9,5), pero a su vez, superó al Tratamiento 3 ($n = 20$ ovocitos; Promedio: 5). Sin embargo, es importante destacar que Sakaguchi et al., (2018) utilizaron una única inyección de FSH-p epidural en vacas, obteniendo un promedio de ovocitos recuperados de $18,3 \pm 5,4$. En comparación, la respuesta de recuperación del tratamiento de FSH-p intramuscular, tuvo un promedio inferior ($10,9 \pm 7,6$), aunque sin una diferencia estadística significativa. En esta investigación, se utilizaron dosis de FSH-p de 20AU (administrada dos veces al día durante 3 días) para la vía intramuscular y una única inyección epidural de 30AU para la vía epidural. Se ha demostrado que la FSH-p administrada vía epidural se absorbe de manera más lenta debido a la presencia de grasa en la médula (Satılmış et al., 2015). En otro estudio se aplicó diferentes dosis de FSH, FSH/eCG, FSH/LH, FSH/LH + eCG, se observó una tasa de recuperación más alta con la dosis (200mg de FSH, 300UI eCG) de FSH/eCG, alcanzando el 62.78%. A pesar de esta diferencia numérica no se encontró diferencia entre tratamientos. Esto puede deberse a la vida media prolongada de la eCG, que deriva en un reclutamiento continuo de folículos y una mayor probabilidad de obtener más ovocitos al combinarla con FSH (Salas, 2015).

En la clasificación de los ovocitos por grados (I, II, III, IV), el Tratamiento 1 destaca con un porcentaje de 25.8%, aunque no se observa una diferencia estadística en comparación con los otros tratamientos. Sin embargo, es interesante notar que, al contrastar estos resultados con el estudio de Sakaguchi et al., (2018), el Tratamiento 1 muestra similitud

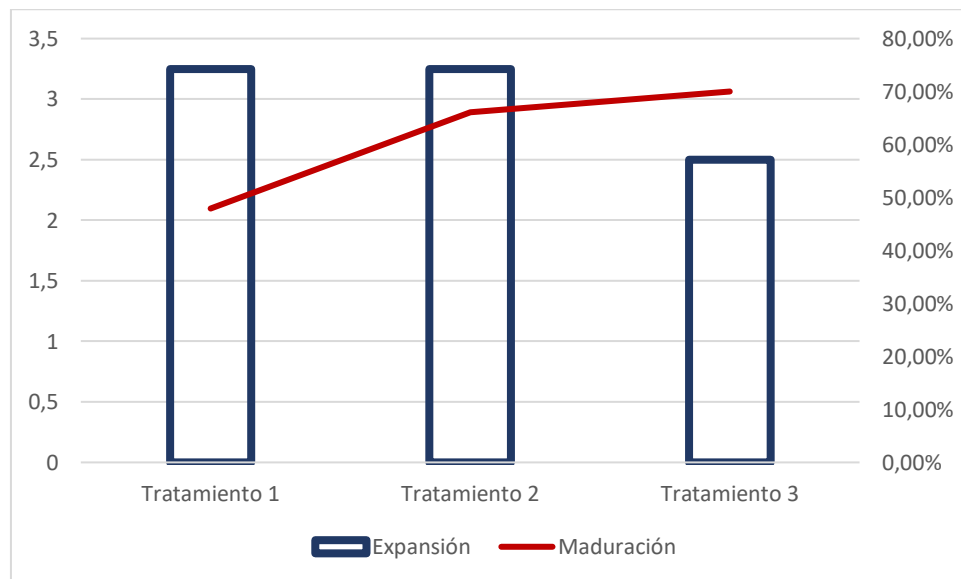
con sus hallazgos. En dicha investigación, los ovocitos de grado I obtenidos a través del protocolo de FSH-p epidural ($13,9 \pm 6,4$) superaron al protocolo control ($11,8 \pm 6,2$). Este resultado se atribuye a la mejora en el desarrollo de la competencia de los ovocitos cuando la FSH-p activa la aromatasa P450, estimulando la producción de estradiol en las células de la granulosa. Estas células que cuentan con receptores para la FSH, también producen inhibidores que colaboran con la FSH para regular la liberación de esta hormona por parte de la hipófisis. Esto es crucial, ya que la FSH estimula la síntesis de estradiol en los folículos en desarrollo (Simonetti, 2008)

Tabla 2. Tabla de expansión y maduración

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Valor p
N	4	4	4	
Expansión (escala 1-4)	3,25	3,25	2,50	0,667
Maduración (%)	47,92%	66,07%	70,01%	0,615

La Tabla 2, el Tratamiento 1, la expansión de 3.25 es similar a la del Tratamiento 2 y supera a la del Tratamiento 3. En cuanto a la maduración, el Tratamiento 1 presenta un promedio de 47.92%, que es inferior al Tratamiento 2 (66.07%) y al Tratamiento 3 (70.01%). Es importante señalar que los resultados estadísticos para tanto la expansión como la maduración fueron comparables (Expansión p: 0.667; Maduración p: 0.615).

Figura 5. Figura de expansión y maduración

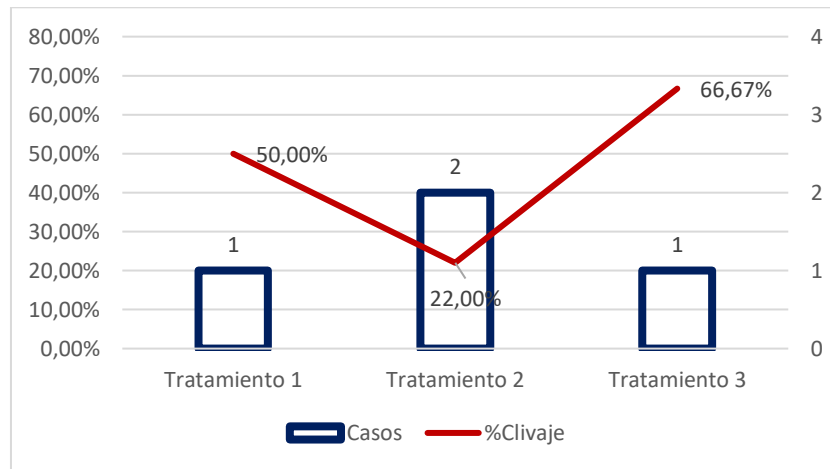


La Figura 5 ilustra de manera visual la relación entre la expansión y la maduración en cada uno de los tratamientos.

La calidad de expansión de las células del cúmulo en el tratamiento bajo investigación (T1) se equiparó a la del tratamiento convencional (T2) y superó a la del tratamiento control (T3). Este hallazgo indica una alta calidad en la

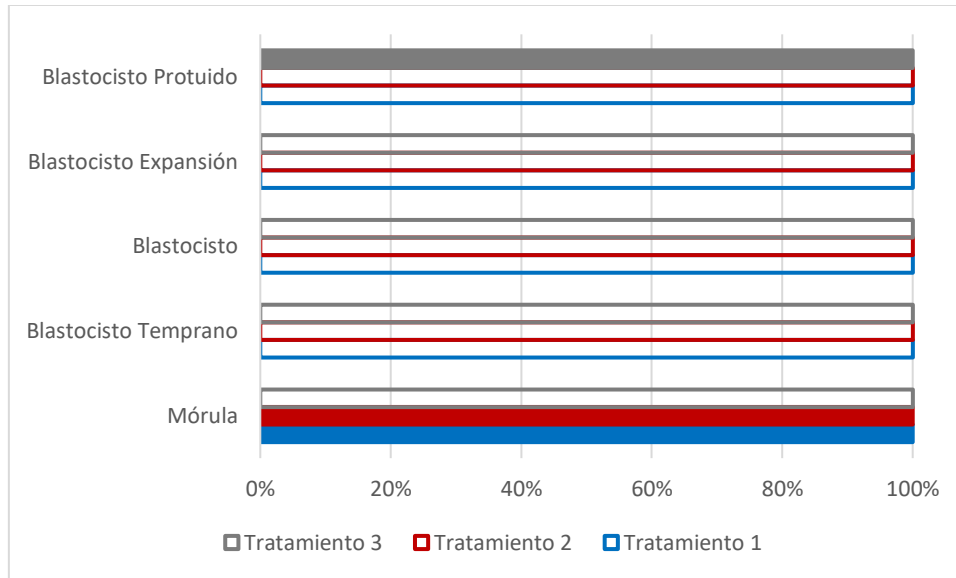
expansión de las células del cúmulo en el tratamiento 1. Este resultado es congruente con un estudio previo realizado en vacas, donde se comparó el uso de una sola dosis de FSH-p vía epidural frente a FSH-p vía intramuscular. En dicho estudio, se observó una calidad de expansión de células del cúmulo similar a la del tratamiento con el que se comparó, se atribuye este efecto positivo a la FSH, ya que contribuye al aumento del diámetro de los folículos y mejora el desarrollo de los ovocitos sin afectar la morfología de los complejos cúmulo-ovocito (Chumchai et al., 2021)

Figura 6. Clivaje



En la Figura 6 se presenta los casos que alcanzaron la maduración y el porcentaje que logró avanzar al proceso de clivaje. En el Tratamiento 1, se registró un caso con un porcentaje de clivaje del 50%. Para el Tratamiento 2, se observaron 2 casos con un porcentaje de división del 22%. En cuanto al Tratamiento 3, se obtuvo 1 caso con un porcentaje de división del 66.7%, siendo este el más alto entre los tratamientos analizados.

Figura 7. Maduración



En la Figura 7, se detallan todas las opciones disponibles en la producción *in vitro*. Se observa que el resultado del Tratamiento 3 alcanzó la etapa de blastocito protruido, mientras que tanto el Tratamiento 1 como el Tratamiento 2 llegaron a la fase de mórula.

En la Fase de Maduración, se emplearon 70 ovocitos, distribuidos en dos grupos: uno conformado por 28 unidades y otro por 42. En conjunto, se logró la fertilización del 8,57% de los ovocitos. En este contexto, el 3,57% de los ovocitos del primer grupo alcanzaron este punto, en contraste con el 11,9% del segundo grupo, lo que refleja diferencias notables entre los dos grupos. Es importante destacar que todos los ovocitos del segundo grupo llegaron exitosamente a la fase de maduración.

La clasificación se basó en los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS). Se determinó que tanto el Tratamiento 1 como el Tratamiento 2 habían alcanzado el estadio de mórula, lo que los califica como embriones transferibles. Este hallazgo coincide con el trabajo de Sakaguchi et al., (2018), donde los embriones que lograron llegar al estado de mórula también se consideraron transferibles. En el estudio, la aplicación de 176 unidades de FSH en una única dosis con 500UI de eCG, lo que resultó en un mayor número de embriones viables en comparación con los tratamientos que solo utilizaron FSH en diferentes dosis. La inclusión de eCG en una dosis moderada promovió la maduración del folículo dominante, lo que se tradujo en una tasa de ovulación más elevada y un mejor desarrollo posterior del cuerpo lúteo (Simonetti, 2008).

Conclusiones

La estimulación ovárica en ovejas con la aplicación de FSH-p epidural en la producción *in vitro* de embriones demostró que no existe diferencia frente a la aplicación de FSH-p intramuscular. En la recuperación de ovocitos el promedio del T1 (8.25%) fue superado por un mínimo 1.20 puntos del T2 (9.5%), sin embargo, cabe destacar que el T1 resaltó con el mayor porcentaje en la clasificación de embriones de mejor grado (25.8% - grado I) y en la expansión de las células del cúmulo el T1 se equiparó al T2 y superó al T3 sin diferencias entre tratamientos, la aplicación de FSH ha sido estudiada en ovejas y otros rumiantes sugiriendo continuar futuras investigaciones en diferentes dosis y vías de aplicación.

Bibliografía

1. Accardo, C., Dattena, M., Pilichi, S., Mara, L., Chessa, B., & Cappai, P. (2004). Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; Embryo development and viability. *Animal Reproduction Science*, 81(1–2), 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.10.004>
2. Blackmore, D. G., Baillie, L. R., Holt, J. E., Dierkx, L., Aitken, R. J., & McLaughlin, E. A. (2004). Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 71(2), 661–668. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028779>
3. Carrasco, R. A. (2012). Uso de azul brillante de cresilo en la selección de ovocitos bovinos: implicancias en la maduración nuclear y citoplasmática in vitro. Universidad Austral De Chile.
4. Chumchai, R., Ratsiri, T., Ratchamak, R., Vongpralub, T., Boonkum, W., & Chankitisakul, V. (2021). Ovarian responses and FSH profiles at superovulation with a single epidural administration of gonadotropin in the Thai-Holstein crossbreed. *Animal Reproduction*, 18(3), 1–11. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0053>
5. Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59(1), 171–188. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01270-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01270-0)
6. Cuadrado, F. (2012). Evaluación de Ovocitos Ovinos por Microscopia de Luz Polarizada. Universidad de Oviedo.
7. De los Reyes, M. (2011). Maduración nuclear y citoplasmática in vitro en ovocitos de perra. *Spernova*, 1, 53–57.
8. De Vantéry, C., Stutz, A., Vassalli, J. D., & Schorderet-Slatkine, S. (1997). Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental Biology*, 187(1), 43–54. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8599>
9. De Wit, A. A., Cesar, M. F., & Kruip, T. M. (2001). Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes. *Journal of Dairy Science*, 84(8), 1800–1804. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74618-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74618-8)
10. Feijo, A., Mira-Naranjo, J., & Erazo-Rodriguez, F. (2018). “Valoración económica de la producción de ovinos Pelibuey y Black Belly y las perspectivas de su desarrollo en el mercado del cantón Pastaza”. *Observatorio de La Economía Latinoamericana*, Eumednet., 7(1), 1–24. <https://doi.org/10.23857/pc.v7i1.3487>
11. Fernández Reyes, F., Hernández Pichardo, J., & Pichardo Cruz, A. (2007). Maduración in vitro de ovocitos de ovino usando concentraciones de FSH + LH y FSH en medio de cultivo. *Revista de Salud Animal*, 29(2), 105–110.
12. Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., & Navarro, P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71(5), 836–848. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>
13. Gadea, J., & Gardón, J. (2003). Efecto del medio de fecundación in vitro sobre el patron de reaccion

acrosomica en el espermatozoide bovino 1. 19, 15–22.

14. Huanca, W., Condori, R., Chileno, M., García, P., Cainzo, J., & Becerra, J. (2014). Evaluación de cuatro tiempos de cultivo sobre la tasa de maduración y división post-fecundación in vitro de ovocitos de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 25(4), 468–476. <https://doi.org/doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10782>
15. Krisher, R. L., Brad, A. M., Herrick, J. R., Sparman, M. L., & Swain, J. E. (2007). A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Animal Reproduction Science*, 98(1–2), 72–96. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.006>
16. 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. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 38, Issue 4, pp. 259–267). <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x>
17. O'Brien, J. K. (1996). Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reproduction, Fertility and Development*, 8(7), 1029–1037. <https://doi.org/10.1071/RD9961029>
18. Robledo, J., Herrera, J., Cajero, M., Navarro, M., & García, A. (2009). Evaluacion del desarrollo embrionario in vitro en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, 95–99. <https://doi.org/doi.org/10.24275/uami.j38607103>
19. Sakaguchi, K., Ideta, A., Yanagawa, Y., Nagano, M., Katagiri, S., & Konishi, M. (2018). Effect of a single epidural administration of follicle-stimulating hormone via caudal vertebrae on superstimulation for in vivo and in vitro embryo production in Japanese black cows. *Journal of Reproduction and Development*, 64(5), 451–455. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-007>
20. Salas, A. G. (2015). Respuesta ovulatoria y embrionaria con FSH y FSH/LH en combinación de eCG en ovejas pelibuey. Instituto de Enseñanza e Investigacion de Ciencias Agrícolas.
21. Satılmış, M., Ali, M., Sevgi, R., Hamdi, S., Okuroğ, A., Ertem, T. B., & Tavli, Z. (2015). The Effect of Epidural Application of FSH on Superovulatory Response in Eastern Anatolian Red Cow. 61(2), 82–87. <https://doi.org/doi.org/10.46897/livestockstudies.610206>
22. Simonetti, L. (2008). Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale. In Riunet. Universidad Politecnica de Valencia.
23. Sun, Q. Y., & Nagai, T. (2003). Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, 49(5), 347–359. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.347>
24. Tamay, E., & Velez, F. (2018). Efecto de la melatonina en la criopreservacion de espermatozoides equinos. In Universidad de Cuenca (Issue 1). Universidad de Cuenca.
25. Tarazona, A., López, A., & Olivera-Angel, M. (2010). La competencia del ovocito: Qué, cómo y cuándo. *Acta Biologica Colombiana*, 15(3), 3–18.
26. Thompson, J. G. (2000). In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - A decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 263–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00096-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00096-8)

27. Ugalde, J. R., Cervera Paúl, D., Domínguez Rebolledo, Á., Baeza-Rodríguez, J., Pinzón-López, L., & Zamora-Bustillos, R. (2020). Fertilización in vitro (FIV) de ovocitos obtenidos en ovejas mediante la técnica de recolección laparoscópica de óvulos. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 81, 15–23. <https://doi.org/10.33064/icycaa2020813137>
28. Van Den Hurk, R., & Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63(6), 1717–1751. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>
29. Vargas Espin, P. (2018). Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes. In *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* (Vol. 31, Issue 1).

ANEXOS



Ilustración 1 Unidades Experimentales



Ilustración 2 oveja en cama quirúrgica

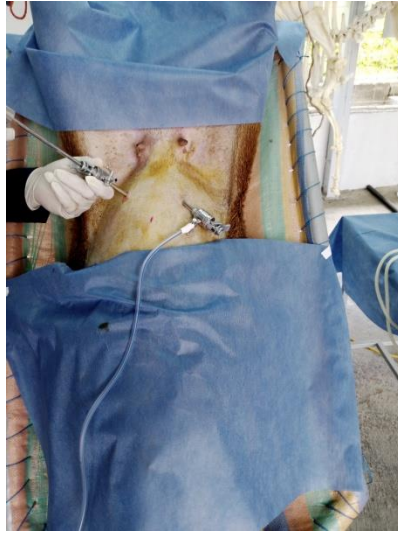


Ilustración 3 Técnica de aspiración folicular OPU (Ovum Pick-Up)



Ilustración 4 embriones madurados (Tinción de Hoechst)



Ilustración 5 presencia de corpúsculo polar

Cuenca, 01 de diciembre de 2023

Asunto: Embargo Temporal del Trabajo de Titulación

Señora,

Ing. Verónica Vivar Serrano, Mgs.,

Decano de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias,


Cuenca.

De mi consideración:

Señor Decano, Carlos Julio Pacheco Pacheco como autor del Trabajo de Titulación "Estimulación Ovárica en Ovejas con la Aplicación de FSH-p Epidural en la Producción in vitro de Embriones" y Ing. Juan Carlos Alvarado Alvarado MsC, como director de la misma, solicitamos a usted y por su digno intermedio a Biblioteca y al responsable del repositorio institucional, el EMBARGO TEMPORAL del mismo, por un lapso de un 1 año, con la finalidad de evaluar su contenido con fines de publicación de artículo científico en una revista indexada. Entiendo que luego de vencido este período automáticamente la obra será puesta a disposición del público bajo las normas de gestión de la Universidad.

Por la atención que sepa dar al presente, nos suscribimos de usted muy agradecidos.

Atentamente,



Ci: 0104287040
Autor: Carlos Julio Pacheco Pacheco

C.C.: Biblioteca