



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS
BOVINOS UTILIZANDO DOS MEDIOS”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título del
título de Ingeniero/a Biotecnólogo/a

AUTORES: JUAN SEBASTIÁN RAMÍREZ ROBALINO

LOURDES DEL ROCIO ORELLANA PAUCAR

TUTOR: DR. FROILÁN PATRICIO GARNICA MARQUINA

Cuenca - Ecuador

2025

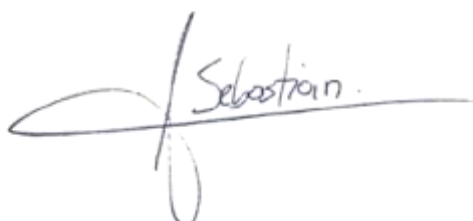
CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Juan Sebastián Ramírez Robalino con documento de identificación N° 0706160538, y Lourdes Del Rocio Orellana Paucar con documento de identificación N° 0103698718; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 10 de julio de 2025

Atentamente,



Juan Sebastián Ramírez Robalino
0706160538



Lourdes Del Rocio Orellana Paucar
0103698718

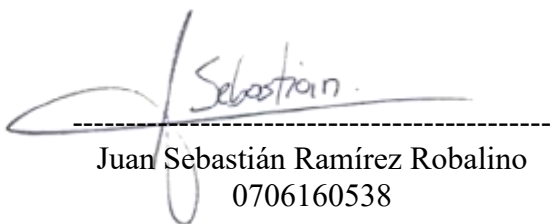
CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Juan Sebastián Ramírez Robalino con documento de identificación N° 0706160538, y Lourdes Del Rocio Orellana Paucar con documento de identificación N° 0103698718, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación de la eficiencia de maduración in vitro de ovocitos bovinos utilizando dos medios”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero/a Biotecnólogo/a, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 10 de julio de 2025

Atentamente,



Juan Sebastián Ramírez Robalino
0706160538



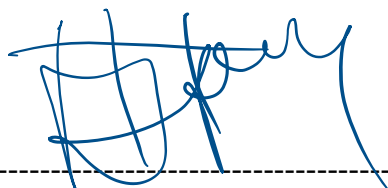
Lourdes Del Rocio Orellana Paucar
0103698718

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Froilán Patricio Garnica Marquina con documento de identificación N° 0101650299, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS UTILIZANDO DOS MEDIOS”, realizado por Juan Sebastián Ramírez Robalino con documento de identificación N° 0706160538 y por Lourdes Del Rocio Orellana Paucar con documento de identificación N° 0103698718, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 10 de julio de 2025

Atentamente,



Dr. Froilán Patricio Garnica Marquina
0101650299

DEDICATORIA

De manera especial dedico este trabajo a mi esposo Diego Montero por ser el pilar fundamental, en todo este proceso, por apoyarme todos los días y alentarme cada uno de ellos, por buscar siempre la mejor manera para que pueda cumplir mis tareas, proyectos, exámenes, por aguantar las malas noches y preocuparse en cada una de ellas, gracias por su apoyo, dedicación y amor que fue fundamental para poder terminar este sueño.

A mis hijas Sofia y Luna por el tiempo y momentos importantes que no pude compartir con ustedes por su comprensión y apoyo durante este camino recuerden que los sueños se vuelven realidad no importa el tiempo ni la edad.

Dedico este trabajo a mi madre Laura Paucar por ser parte importante en la culminación de este sueño gracias por su constancia y confianza brindada, a mi hermana Doris que desde la distancia su apoyo fue incondicional.

Lourdes

Dedico este triunfo a mis padres, Juan Patricio y Marjorie Lizteh, quienes han sido mi mayor apoyo en la vida, gracias por su confianza y enseñanza incondicional y constante, gracias por sus ejemplos éticos y morales, gracias por su inspiración y motivación diaria para que me forme como un buen profesional y una excelente persona.

Dedico con todo mi corazón este triunfo a mis abuelas, Luz y Rosa, por su amor incondicional, sus oraciones, su ejemplo de fortaleza y por ser una fuente constante de inspiración en mi vida. Este logro también es de ustedes.

Dedico especialmente este logro una persona muy especial, quien, aunque en este momento no esté presente físicamente siempre lo llevaré en mi corazón, gracias a que por sus

sabios consejos y guía constante me enseñó el valor de la perseverancia, mi abuelo Bolívar Robalino.

Dedico este logro importante a mis hermanos Lizeth, Patricio Miguel y Juan Patricio por tenerme un amor incondicional y por ser un ejemplo de lucha constante, gracias por brindarme su apoyo siempre que lo necesité y por cuidar de mi en todo momento.

Sebastián

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial a Sebas Ramírez por ser el mejor compañero lo que hizo fácil este trabajo, su empeño, esfuerzo, carisma, estas cualidades nos permitió cumplir con todas las metas que nos planteamos en nuestro proyecto, que su camino siempre sea el mejor.

A mi tutor de tesis Doctor Patricio Garnica, gracias por haber confiado en nosotros, por su apoyo desde el primer momento por su dirección y consejos para culminar el mismo.

Agradezco la ayuda brindada por la doctora Mónica Espadero, por la confianza y su apoyo, a la Magister Paulina Tamayo al igual que al Magister Paúl Arévalo gracias por su apoyo y consejos, al Magister Marlon Loayza por el apoyo brindado en cada etapa del mismo.

Un agradecimiento especial al Ingeniero Galán representante del camal municipal de la ciudad de Cuenca, el apoyo brindado fue fundamental para poder llevar a cabo el proyecto.

Lourdes

Agradezco a Dios por permitirme llegar a este momento y poder compartirlo con mis seres queridos.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo que me han brindado, principalmente a mis padres, abuelos y hermanos, quienes a través de sus enseñanzas y consejos me motivaron a lograr este objetivo profesional.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi compañera de tesis, Lourdes Orellana, por su dedicación, compromiso y el valioso trabajo en equipo que realizamos durante todo este proceso. Su apoyo constante y su actitud positiva fueron fundamentales para alcanzar esta meta.

Agradezco al Magister Marlon Loayza, a la Doctora Mónica Espadero y a la Magister Paulina Tamayo, por apoyo y palabras positivas para lograr cumplir esta meta

A mi tutor, Doctor Patricio Garnica, por su tiempo y enseñanzas para lograr este valioso trabajo, gracias a su apoyo, paciencia y dedicación logré concluir el proyecto.

A mis compañeros de carrera, gracias por compartir conmigo estos años de esfuerzo, aprendizaje y crecimiento, Ingeniero Diego Duy, Jorge Delgado y Joel Escobar

A mis amigos, gracias por estar siempre presentes, por sus palabras de aliento y por celebrar conmigo cada pequeño logro.

Sebastián

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	17
INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. PROBLEMÁTICA.....	17
1.2. ANTECEDENTES	19
1.3. DELIMITACIÓN.....	20
1.3.1. Delimitación geográfica	20
1.3.2. Delimitación sectorial	20
1.4. OBJETIVOS	21
1.4.1. Objetivo General	21
1.4.2. Objetivos Específicos.....	21
1.5. HIPÓTESIS	21
CAPÍTULO 2.....	22
MARCO TEÓRICO	22
2.1. Desarrollo y maduración de ovocitos in vivo	22
2.2. Maduración <i>in vitro</i>	23
2.3. Ventajas y aplicaciones de la maduración <i>in vitro</i>	24
2.4. Medio de maduración	25
2.5. Tasa de maduración	25
2.6. Medio TCM-199	26
2.7. Suero Fetal Bovino	26

2.8. Piruvato de sodio	26
2.9. Gonadotropinas	27
2.10. Sulfato de gentamicina.....	27
2.11. Ovocitos.....	28
2.12. Calidad de los ovocitos.....	28
2.13. Principales desafíos biológicos en la MVI que afectan el desarrollo de los ovocitos	30
2.14. Cámara de incubación: condiciones del cultivo	30
CAPÍTULO 3.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. MATERIALES	32
3.1.1. Material de laboratorio	32
3.1.2. Equipos de laboratorio	32
3.1.3. Reactivos químicos	32
3.1.4. Material biológico	33
3.2. METODOLOGÍA	33
3.2.1. Nivel de investigación.....	33
3.2.2. Diseño de investigación	33
3.2.3. Diseño del experimento.....	33
3.2.3.1. Variables de estudio	34
3.2.3.2. Número de tratamientos y réplicas.....	34

3.2.4. Experimentación de laboratorio	35
3.2.4.1. Recolección y transporte de ovarios bovinos	35
3.2.4.2. Desinfección de laboratorio	36
3.2.4.3. Preparación de insumos de laboratorio	37
3.2.4.3.1. Preparación del medio experimental	37
3.2.4.4. Lavado de ovarios	38
3.2.4.5. Extracción del líquido folicular de ovarios	39
3.2.4.6. Selección y lavado de ovocitos	40
3.2.4.7. Inoculación de ovocitos.....	41
3.2.5. Evaluación de los ovocitos	42
3.2.6. Población y muestra	42
3.2.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	42
3.2.8. Análisis estadístico	43
3.2.9. Análisis económico	44
3.2.9.1. Eficiencia técnica experimental	44
3.2.9.2. Eficiencia económica unitaria	44
3.2.9.3. Análisis relación costo/beneficio	45
CAPÍTULO 4.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1. RESULTADOS.....	46
4.1.1. Maduración de ovocitos	46

4.1.2. Prueba Chi-cuadrado	47
4.1.3. Prueba T-student	47
4.1.4. Calidad de los ovocitos	49
4.1.5. Análisis económico	50
4.2. DISCUSIÓN.....	52
CAPÍTULO 5.....	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1. CONCLUSIONES.....	56
5.2. RECOMENDACIONES.....	57
ANEXOS	68
Anexo 1. Evidencia fotográfica	68
Anexo 2. Gastos de experimentación	69
Anexo 3. Hoja de laboratorio	70
Anexo 4. Permiso EMURPLAG - EP	71

Índice de Tablas

Tabla 1. Variables de estudio.	34
Tabla 2. Diseño del experimento.....	35
Tabla 3. Ovocitos madurados por réplica.....	46
Tabla 4. Resultado de la prueba Chi-cuadrado.....	47
Tabla 5. Resultado de la prueba de Shapiro-Wilk y Prueba F.	48
Tabla 6. Resultado de la prueba T-student.	48
Tabla 7. Coeficiente de variación.....	48
Tabla 8. Detalle del costo por tratamiento y datos de experimentación.....	51
Tabla 9. Resultado del análisis económico.	51

Índice de Figuras

Figura 1. Crecimiento y maduración de los ovocitos, fertilización y desarrollo embrionario temprano.....	22
Figura 2. Desarrollo de ovocitos y embriones bovinos tempranos de origen in vivo e in vitro.	23
Figura 3. Ovocito bobino.	28
Figura 4. Complejos cúmulo-ovocito bovinos (COC) tras la extracción del ovario, clasificados según su morfología	29
Figura 5. Ovarios bovinos.	36
Figura 6. Lavado de ovarios.....	39

Figura 7. Recuperación de ovocitos.	39
Figura 8. Recuperación de ovocitos.	41
Figura 9. Ovocitos inoculados.....	41
Figura 10. Distribución del número de ovocitos maduros y no maduros por réplica.	47
Figura 11. Distribución del número de ovocitos maduros en los dos medios de maduración.	49
Figura 12. Calidad de ovocitos maduros.	50

RESUMEN

La maduración *in vitro* de ovocitos ha emergido como una herramienta de vanguardia que contribuye a la reproducción asistida y el mejoramiento genético del ganado. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos mediante el uso de un medio experimental y un medio comercial. La metodología se basó en un enfoque descriptivo-explicativo y un diseño experimental e inductivo de investigación. Se diseñaron 2 tratamientos: uno con medio experimental (A) y otro con medio comercial (B); cada tratamiento tuvo 6 réplicas, cada una conformadas por 10 ovocitos. La fase de experimentación contempló desde la recolección y transporte de ovarios bovinos, hasta la valoración de los ovocitos maduros. Para el análisis de datos se empleó estadística descriptiva, así como pruebas de chi-cuadrado y t-student. El análisis económico consideró la eficiencia técnica experimental y análisis de relación costo beneficio. Los resultados demuestran que el número promedio de ovocitos maduros fue de 8 unidades para ambos medios, mostrando una eficiencia técnica experimental del 80%. Las pruebas Chi-cuadrado y t-student no reflejaron diferencias significativas en los dos tratamientos (p -valor > 0.05). Los ovocitos maduros se mostraron bien organizados con estructuras uniformes de color y textura homogéneas. El costo asociado al medio de maduración experimental y comercial fue de 0,89 y 3,60 USD respectivamente. La relación costo-beneficio indicó que el medio experimental logró aproximadamente 53 ovocitos maduros por dólar invertido, mientras que el medio comercial solamente 13 ovocitos, demostrando un mayor retorno de inversión en el medio experimental. En síntesis, la implementación del protocolo experimental demostró que el medio de maduración experimental ajustado presenta un desempeño similar al comercial, en cuanto a idoneidad para inducir la maduración *in vitro* de ovocitos, y una mejor rentabilidad económica.

Palabras claves: Ovocitos bovinos, biotecnología reproductiva, cultivo celular, maduración *in vitro*.

ABSTRACT

In vitro oocyte maturation has emerged as a cutting-edge tool contributing to assisted reproduction and genetic improvement of livestock. The objective of this study was to evaluate the in vitro maturation efficiency of bovine oocytes using an experimental medium and a commercial medium. The methodology was based on a descriptive-explanatory approach and an experimental and inductive research design. Two treatments were designed: one with experimental medium (A) and another with commercial medium (B); each treatment had 6 replicates, each consisting of 10 oocytes. The experimental phase included the collection and transportation of bovine ovaries and the evaluation of mature oocytes. Descriptive statistics and chi-square and student t tests were used for data analysis. The economic analysis considered experimental technical efficiency and cost-benefit analysis. The results show that the average number of mature oocytes was 8 units for both media, showing an experimental technical efficiency of 80%. The Chi-square and Student t tests did not reflect significant differences between the two treatments (p -value > 0.05). Mature oocytes were well organized with uniform structures of homogeneous color and texture. The costs associated with the experimental and commercial maturation media were \$0.89 and \$3.60, respectively. The cost-benefit ratio indicated that the experimental medium yielded approximately 53 mature oocytes per dollar invested, while the commercial medium yielded only 13 oocytes, demonstrating a higher return on investment for the experimental medium. In summary, the implementation of the experimental protocol demonstrated that the adjusted experimental maturation medium presents a performance similar to the commercial one, in terms of suitability for inducing in vitro oocyte maturation, and better economic profitability.

Keys words: Bovine oocytes, reproductive biotechnology, cell culture, in vitro maturation.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. PROBLEMÁTICA

La reproducción animal es fundamental en la industria agropecuaria, donde la eficiencia reproductiva es la clave para el éxito biológico y económico, y en el ganado bovino, la obtención de crías de alta calidad genética garantiza la productividad y rentabilidad del sector (Mancheno-Herrera y colaboradores, 2024). La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos realizada en condiciones controladas de laboratorio, ha emergido como una herramienta de vanguardia en la biotecnología reproductiva y la reproducción asistida, su impacto ha trascendido los límites convencionales, revolucionando distintas áreas, al posibilitar el desarrollo ovárico fuera del organismo animal (Behera, 2023).

La MIV siendo un proceso clave en la biotecnología reproductiva, las tasas de maduración aun presentan limitaciones debido a factores como la calidad de los ovocitos, la composición del medio de maduración y las condiciones del proceso. Esto ha impulsado la búsqueda de formulaciones alternativas más accesibles y efectivas (Sjunnesson, 2020).

El avance en las técnicas de MIV requiere no solo de conocimiento biológico, sino también de estrategias que permitan reducir la dependencia de insumos de alto costo. Es así que muchos laboratorios enfrentan desafíos al replicar condiciones estables de cultivo debido a la escasa disponibilidad de medios alternativos que cumplan con criterios de calidad, esto ha generado interés por desarrollar propuestas que integren componentes accesibles y procedimientos adaptados, permitiendo evaluar la maduración ovocitaria desde una perspectiva práctica y coherente con las condiciones de cada entorno de trabajo (Molina-Pinto, 2023).

Aunque existen medios comerciales diseñados para este propósito, su alto costo y la variabilidad en la respuesta de los ovocitos, la combinación de nutrientes, factores de crecimiento y hormonas en el medio de maduración juegan un papel clave en el desarrollo de estos, por lo que es esencial evaluar distintas formulaciones para determinar su impacto (Ferré y colaboradores, 2020).

La posibilidad de ajustar la composición de los medios de cultivo se plantea como una opción valiosa para aumentar la eficiencia y sostenibilidad de la MIV en bovinos. Investigaciones previas han evidenciado que la modificación de las concentraciones de ciertos componentes en los medios de maduración puede mejorar los resultados sin afectar la calidad embrionaria (Tinoco y colaboradores, 2024). No obstante, aún existe un vacío en cuanto a estudios que comparen directamente la efectividad de medios comerciales frente a formulaciones personalizadas bajo condiciones específicas (Molina-Pinto, 2023).

En este contexto, la importancia del presente estudio es crucial para optimizar la MIV de ovocitos bovinos, considerando que al mejorar esta técnica permitirá incrementar la eficiencia reproductiva y la obtención de embriones de calidad. Según Cívico-Vallejos y colaboradores, (2022), la capacidad de desarrollo del ovocito es esencial para superar con éxito las diferentes etapas de desarrollo embrionario, lo que tiene un impacto directo en la biotecnología reproductiva. Por lo tanto, este trabajo experimental contribuirá al avance en la aplicación de tecnologías innovadoras en reproducción asistida.

Ante lo expuesto previamente, el propósito de este estudio fue el de analizar como el ajuste de los componentes de un medio de maduración experimental influyen en la tasa de maduración y la calidad de los ovocitos, identificando así opciones viables tanto a nivel técnico como económico.

1.2. ANTECEDENTES

La MIV de ovocitos bovinos ha sido objeto de numerosos estudios debido a su potencial para mejorar la eficiencia reproductiva en la ganadería. Diversas investigaciones han destacado que la composición del medio es un factor crucial para la calidad y tasa de maduración de los ovocitos.

Contreras-Jeronimo, (2023) realizó su investigación con el objetivo de determinar la tasa de maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos de cultivo (18, 20, 22, y 24 horas), considerando diámetros foliculares de 2-4mm y 5-8mm, así como las técnicas de extracción por slin y aspiración. Los resultados evidenciaron significancia estadística para las variables cantidad, calidad y viabilidad de los ovocitos, en función del diámetro folicular y la técnica empleada. Se concluyó que los mejores porcentajes de maduración in vitro se obtuvieron entre las 22 y 24 horas de cultivo, con promedios de 8.12 ± 3.5 y $16.2 \pm 6.84b$. El diámetro folicular más favorable fue el de 2-4 mm, con un promedio de 17.6 ± 9.13 , mientras que la técnica de aspiración presentó mejores resultados, con un promedio de 19.0 ± 7.55 .

Por otro lado, Mejía-Flores et al., (2023), utilizaron el medio TCM-199 como base para el cultivo de ovocitos bovinos, complementado con suero fetal bovino, FSH, hCG, gentamicina y piruvato de sodio, bajo condiciones controladas, con el objetivo de confirmar su efectividad en la maduración in vitro. Los ovocitos fueron obtenidos por aspiración folicular y seleccionados según criterios de calidad propuesto por la IETS. La madurez se determinó inicialmente por la presencia del primer cuerpo polar y fue confirmada mediante la tinción de Hoechst. Los resultados mostraron un 88% de expansión del cúmulo y un 72,7% de ovocitos maduros, lo que respalda la eficiencia del medio TCM-199 y resalta la importancia de utilizar técnicas confiables para evaluar cada etapa del proceso.

En el mismo sentido, Lino-Magaña y Chasi-Olivares, (2021), emplearon una versión modificada del TCM-199, en el que prepararon placas de cultivo con microgotas flotantes, cubiertas con aceite mineral y equilibradas en condiciones controladas de 38, °C, 5% de CO₂ y alta humedad relativa. Los ovocitos que seleccionaron se incubaron durante 24 horas, luego llevaron a cabo la activación partenogénica. El uso del TCM-199 Parker permitió evaluar tasas de clivaje, apoptosis y desarrollo embrionario hasta el día ocho de cultivo, evidenciando su eficacia en la producción de embriones partenogénicos.

Por su parte, Espin -Vargas, (2018), evaluó la MIV de ovocitos bovinos utilizando Suero de Vaca en Celo (SVC) y Suero Fetal Bovino (SFB), utilizó 200 muestras de ovarios bovinos post-mortem, distribuidas en dos grupos, T1 y T2, con 100 ovarios cada uno. Los resultados mostraron que el tratamiento T2, con FBS presentó una media de maduración de 48,23%, superior al 41,81% del T1 con SVC, con una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0,05$). Además, T2 mostró mayores números de ovocitos madurados. Estos resultados sugieren que el FBS mejora la maduración de ovocitos bovinos en comparación con SVC.

1.3. DELIMITACIÓN

1.3.1. Delimitación geográfica

La presente investigación se llevó a cabo en el cantón Cuenca, provincia del Azuay, Ecuador. La recolección de los ovarios bovinos se realizó en el camal municipal de la ciudad.

1.3.2. Delimitación sectorial

Los ensayos se realizaron en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

- Evaluar la eficiencia de maduración in vitro de ovocitos bovinos mediante el uso de un medio experimental y un medio comercial.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Implementar un protocolo ajustando un medio experimental en comparación con un medio comercial para observar las condiciones que influyen en la calidad de maduración.
- Analizar los resultados experimentales utilizando herramientas estadísticas para determinar la eficiencia a través de las tasas de maduración del medio experimental frente al medio comercial.
- Realizar un análisis económico comparativo entre el medio experimental y el medio comercial, evaluando la relación costo-beneficio para determinar la viabilidad económica de las dos formulaciones.

1.5. Hipótesis

El uso del medio experimental para la maduración in vitro de ovocitos bovinos permite obtener tasas de maduración equivalentes o superiores a las obtenidas con un medio comercial, además de representar una alternativa económicamente viable.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Desarrollo y maduración de ovocitos in vivo

El desarrollo y la maduración de los ovocitos bovinos es un proceso complejo delimitado por diversos factores entre los que se destacan los fisiológicos y hormonales. Los ovocitos se logran formar durante la embriogénesis y su maduración ocurre dentro de los folículos ováricos donde reciben estímulos hormonales, además, se destaca que tan solo una pequeña fracción de estos alcanza la capacidad de desarrollo para la fecundación. El proceso finaliza con la ovulación de un ovocito con la capacidad plena para el proceso de fecundación (Roelen, 2020).

La Figura 1 ilustra los procesos que ocurren durante el crecimiento y la maduración de los ovocitos, la ovulación, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano dentro del oviducto, que finalmente conducen al blastocisto, que ya ha ingresado al útero (Wrenzycki, 2018).

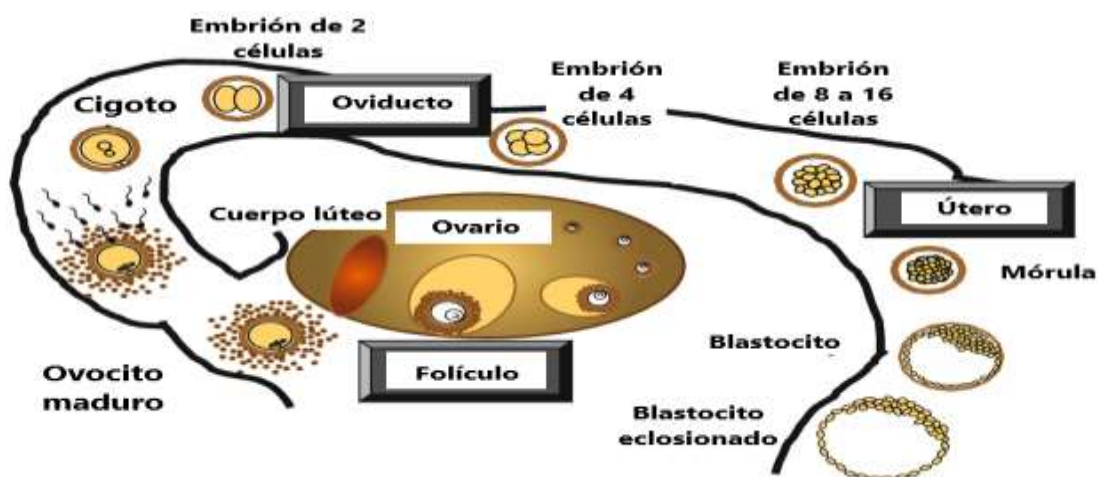


Figura 1. Crecimiento y maduración de los ovocitos, fertilización y desarrollo embrionario temprano. **Fuente:** Tomado de Wrenzycki, (2018).

2.2. Maduración *in vitro*

La MIV de ovocitos en animales es una técnica de reproducción asistida que consiste en la recolección de ovocitos inmaduros de ovarios, los cuales son cultivados en un medio controlado hasta alcanzar su maduración fuera del organismo. Este proceso permite que los ovocitos logren un nivel de desarrollo adecuado antes de ser utilizados en procedimientos de fertilización *in vitro* o en la preservación de la fertilidad. La MIV ha avanzado en los protocolos de cultivo, derivados de estudios realizados en animales y humanos. Esta técnica es particularmente útil en casos de estimulación ovárica mínima o nula (Gilchrist y Smitz, 2023) (ver Figura 2).

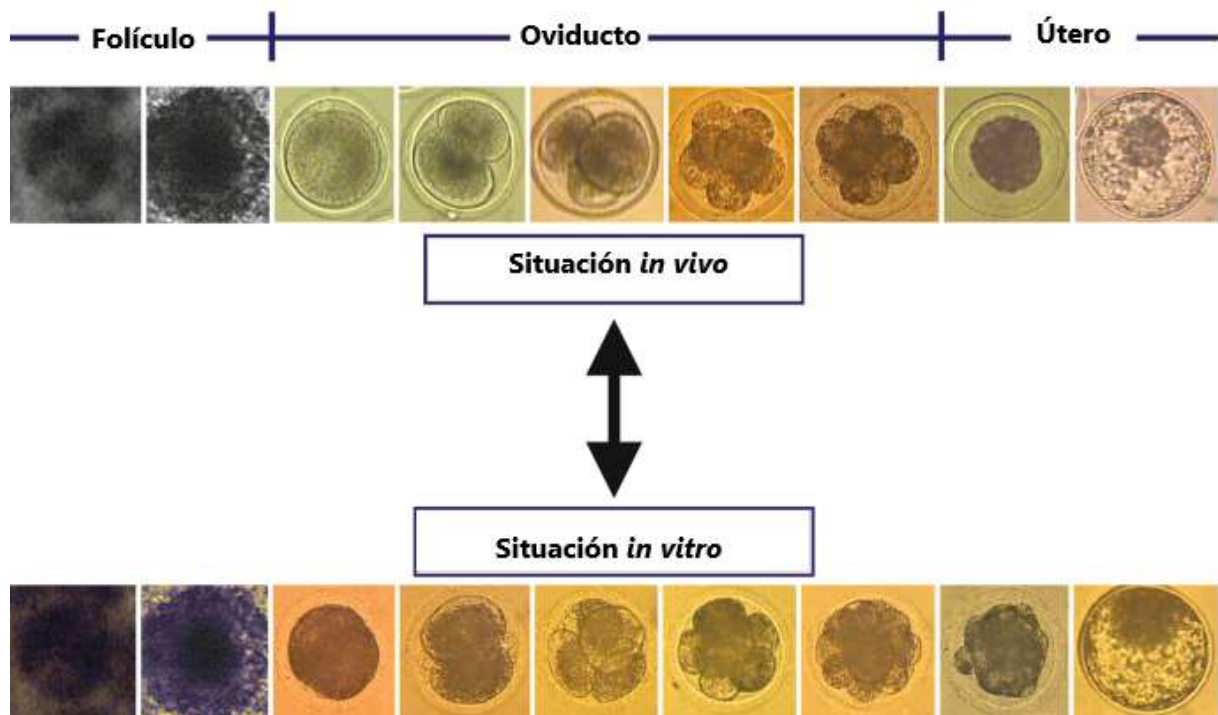


Figura 2. Desarrollo de ovocitos y embriones bovinos tempranos de origen *in vivo* e *in vitro*.

Fuente: Tomado de Wrenzycki, (2018).

La maduración ovocitaria comprende dos fases: la maduración nuclear y citoplasmática. La maduración nuclear comprende la reanudación de la meiosis, desde la ruptura de la vesícula germinal hasta la metafase II, y puede evaluarse de forma no invasiva determinando la extrusión

del primer cuerpo polar. En la maduración citoplasmática intervienen múltiples procesos, entre ellos el metabolismo, la función y localización mitocondrial, la reducción de radicales de oxígeno, la acumulación de folistatina, la programación epigenética, la comunicación entre las células del cúmulo y el ovocito, y la secreción de factores de crecimiento derivados del ovocito (Sirard, 2016, citado en Wrenzycki, 2018).

2.3. Ventajas y aplicaciones de la maduración *in vitro*

La maduración *in vitro* bovina ofrece importantes ventajas y diversas aplicaciones en la biotecnología reproductiva, lo cual permite la recolección y maduración de los ovocitos fuera del animal, facilitando la conservación de los recursos genéticos (Ferré y colaboradores, 2020). Seguidamente se describen los principales beneficios y aplicaciones.

- **Aumento de la producción embrionaria:** Facilita la mejora genética y permite la producción de 50 a 100 embriones por hembra al año, lo que aumenta significativamente el rendimiento de las crías (Reis Silva y colaboradores, 2017).
- **Condiciones de cultivo optimizadas:** Los avances en los medios de maduración, incluidas las soluciones sin suero, han mejorado la calidad de la maduración de los ovocitos y las tasas de desarrollo embrionario (Fernández-Montoro y colaboradores, 2023).
- **Cría de animales:** Esta técnica es fundamental para acelerar el progreso genético permitiendo seleccionar rasgos genéticos en el ganado (Shilpa Doultani y colaboradores, 2024).

- **Esfuerzos de conservación:** Permite preservar especies bovinas en peligro de extinción al facilitar el proceso y desarrollo de maduración de ovocitos de poblaciones limitadas (Shilpa Doultani y colaboradores, 2024).
- **Investigación y desarrollo:** Fundamental para estudiar la biología reproductiva y desarrollar nuevas aplicaciones biotecnológicas (Ferré y colaboradores, 2020).

2.4. Medio de maduración

Un medio de maduración está formado principalmente por elementos fundamentales como agua y nutrientes, a los cuales se deben incorporar diversos factores de crecimiento específicos para su desarrollo (Bonnet y colaboradores, 2020). Hoy en día, se dispone de una amplia variedad de medios de cultivo, que incluyen tanto medios líquidos o caldos o medios solidificados con agar, dentro de estos se encuentran los medios enriquecidos, selectivos, diferenciales y especializados (Caycedo-Lozano y colaboradores, 2021).

2.5. Tasa de maduración

Esta hace referencia al porcentaje de células que alcanzan el estado de madurez adecuado, generalmente la fase de metafase II, luego de haber sido cultivado en un medio de maduración durante un tiempo determinado (Tur-Kaspa y colaboradores, 2024). Este indicador permite evaluar la eficiencia del medio y de las condiciones experimentales empleadas en el proceso de MIV, se trata de un criterio fundamental en estudios de reproducción asistida, ya que refleja el potencial del protocolo para obtener resultados competentes (Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, 2021).

2.6. Medio TCM-199

Según Mancheno-Herrera y colaboradores, (2024) destacan que este medio de maduración incluye antioxidantes como el glutatión y el ácido ascórbico, que protegen al ovocito de los daños causados por los radicales libres durante la fertilización. Por su parte, Rodríguez Suástegui, (2012), señalan que el medio comercial TCM-199, ampliamente utilizado en la MIV, es efectivo y ofrece resultados satisfactorios cuando se complementa con suero o derivados animales. Además, este medio también es utilizado ampliamente para el lavado de ovocitos, esto por su particular composición equilibrada, lo que favorece la viabilidad celular (Silva y colaboradores, 2022; Sithole y colaboradores, 2023; Wei y colaboradores, 2022).

2.7. Suero Fetal Bovino

El SFB se obtiene de embriones de vaca y contiene entre 200 y 400 proteínas distintas, además de miles de metabolitos de moléculas pequeñas en concentraciones variables, en los últimos años, la calidad de este suero ha mejorado considerablemente gracias a exhaustivas pruebas y mejoras en los procesos de obtención (Gu y colaboradores, 2023). Es el suplemento más empleado en cultivo celular, debido a su composición compleja suministra los nutrientes esenciales necesarios para el correcto crecimiento de las células (Preciado-Gutiérrez y colaboradores, 2023).

2.8. Piruvato de sodio

El piruvato de sodio ha sido evaluado como componente en medios de MIV de ovocitos en humanos, animales de laboratorio y especies de reproducción. Este compuesto energético estaría implicado en la regulación de la progresión meiótica y en la conservación de la viabilidad de ovocitos que han sido privados de células de cúmulo, las cuales constituyen su principal fuente in vivo, aunque su mecanismo de acción no se comprende completamente, se

considera que su función principal es servir como fuente de energía para la respiración celular (Alcantara da Silva y colaboradores, 2024).

2.9. Gonadotropinas

El uso de gonadotropinas como la FSH y LH en la MIV continúa siendo un tema de debate, especialmente en lo que respecta a su influencia directa en la maduración ovocitaria, la fertilización y el desarrollo embrionario. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la ausencia de estas hormonas en el medio reduce las tasas de maduración. Asimismo, la incorporación combinada de suplementos, incluida las gonadotropinas, ha demostrado efectos positivos en el desarrollo inicial y número de células maduras tanto en modelos bovinos como en humanos y murinos (Quispe-Gutierrez y colaboradores, 2019).

2.10. Sulfato de gentamicina

El sulfato de gentamicina actúa inhibiendo el crecimiento de bacterias, al interferir con la síntesis de proteínas bacterianas. Su efectividad ha sido comprobada en combinación con otros suplementos y antibióticos, como el clorhidrato de oxitetraciclina, demostrando una alta capacidad para prevenir la proliferación bacteriana en medios de cultivo (Fan y colaboradores, 2022).

El uso de la gentamicina se ha asociado con una mejora de las tasas de escisión embrionaria y de formación de blastocistos. Sin embargo, unas concentraciones excesivas de gentamicina o una exposición prolongada podrían provocar efectos citotóxicos y afectar al desarrollo en general, pues, concentraciones bajas pueden ser beneficiosas, mientras que niveles altos podrían dificultar la maduración y la viabilidad embrionaria (Asimaki y colaboradores, 2022).

2.11. Ovocitos

El ovocito constituye una célula de gran tamaño que posee un núcleo voluminoso, altamente activo a nivel transcripcional, conocido como vesícula germinal. Su citoplasma es abundante en orgánulos y proteínas. La función principal del ovocito durante su desarrollo es producir todos los componentes esenciales para garantizar el éxito de ovulación (Strauss y Williams, 2019) (ver Figura 3). La presencia de estructuras como el cuerpo lúteo y el folículo dominante en los ovarios afecta a la calidad de los ovocitos, observándose una mayor frecuencia de folículos más pequeños en las muestras obtenidas en mataderos (Bosch, 2023).

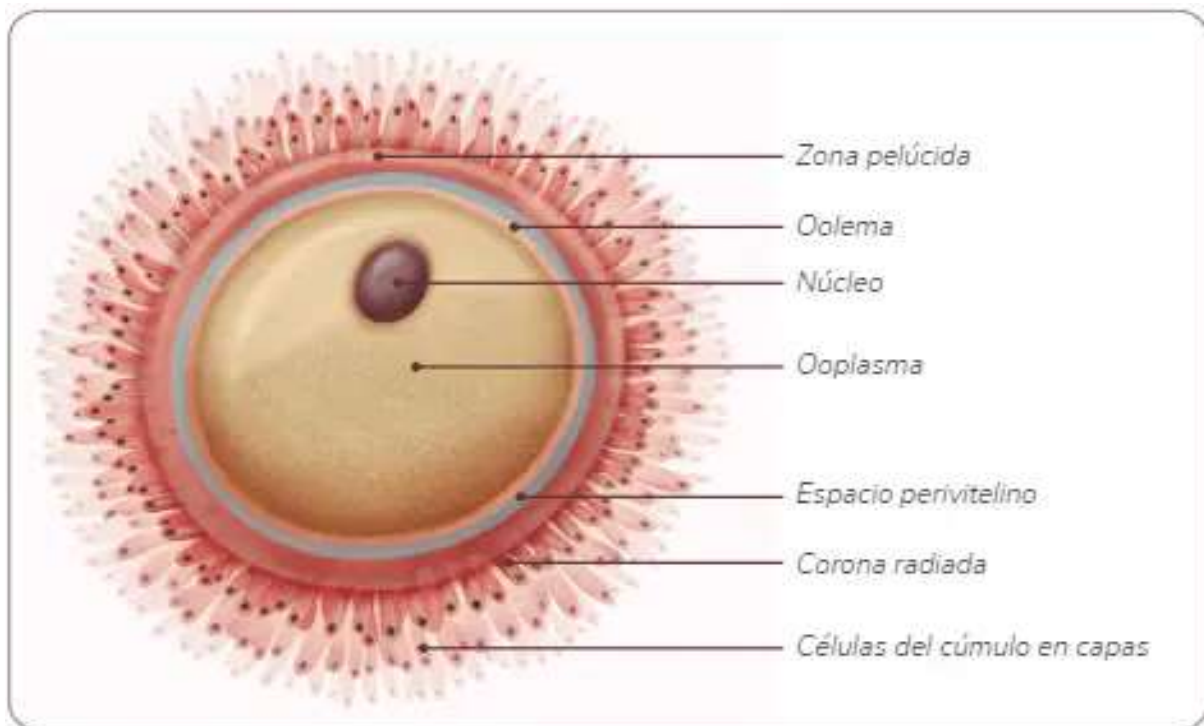


Figura 3. Ovocito bobino. **Fuente:** Tomado de Cortés-Escobar y colaboradores, (2024).

2.12. Calidad de los ovocitos

La calidad del ovocito afecta el éxito de la MIV, la fertilización y el desarrollo del embrión. Los complejos cúmulo-ovocito (COC) se seleccionan para la MIV según parámetros

morfológicos, que incluyen las células del cúmulo y la apariencia del citoplasma del ovocito (Bahrami y Cottee, 2022) (ver Figura 4).

La calidad más saludable del COC (Clase I) se relaciona con una cubierta completa del cúmulo con varias capas de células compactas; la calidad media (Clase II) tiene solo una cubierta parcial del cúmulo y/o un cúmulo ligeramente expandido que contiene menos de cinco capas de células; por último, una calidad deficiente (Clase III) tiene un citoplasma más oscuro y la presencia de manchas oscuras con el cúmulo expandido, todo indicativo de atresia folicular (Águila y colaboradores, 2020).

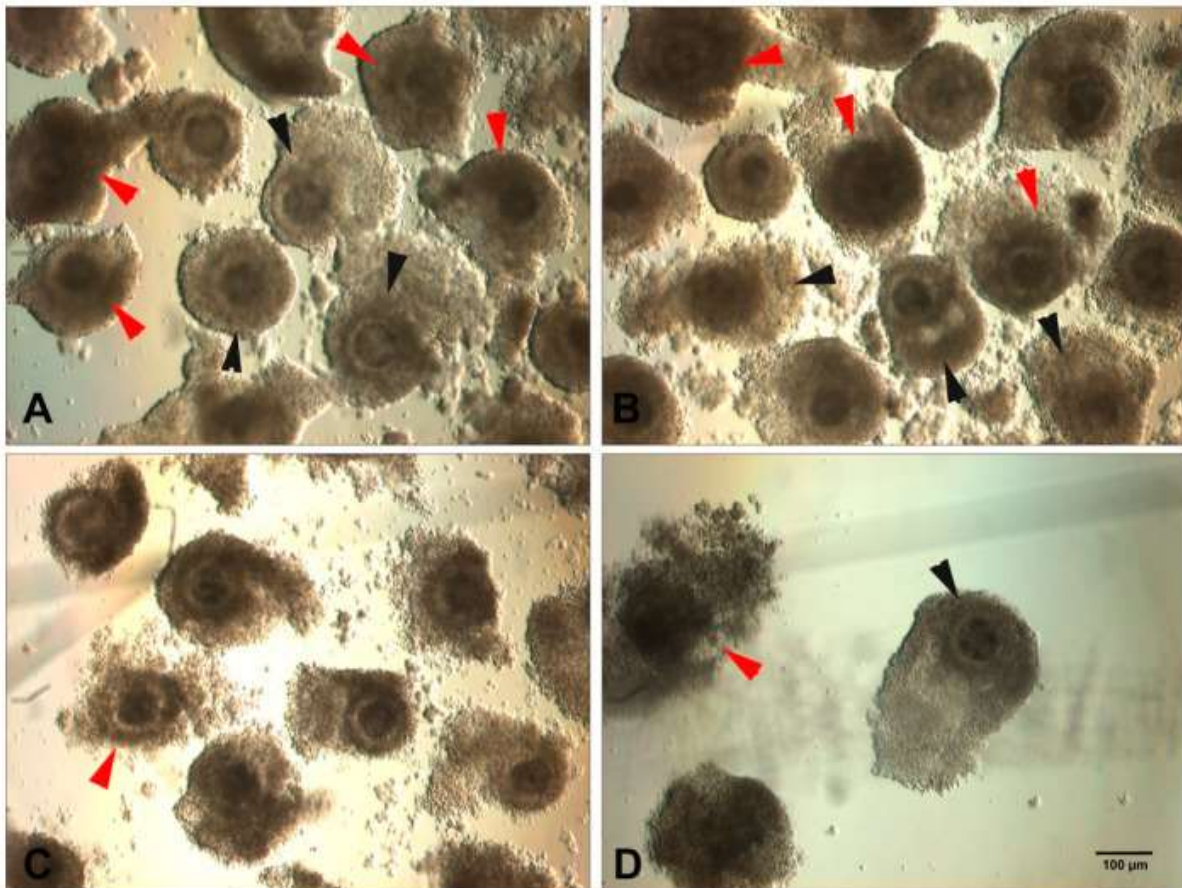


Figura 4. Complejos cúmulo-ovocito bovinos (COC) tras la extracción del ovario, clasificados según su morfología: (A, B) Cobertura completa del cúmulo con varias capas de células compactas (indicado con flechas rojas) y ligeramente dispersas (indicado con flechas negras); (C) Cobertura parcial del cúmulo y capas de células sueltas con signos de atresia temprana

(flecha roja); **(D)** COC que muestra signos claros de atresia (flecha roja) y un citoplasma punteado negro (flecha negra). **Fuente:** Tomado de Águila y colaboradores, (2020).

2.13. Principales desafíos biológicos en la MIV que afectan el desarrollo de los ovocitos

El éxito del uso de la MIV se ve fundamentalmente limitado por tres desafíos biológicos fundamentales, los mismos que representan importantes retos científicos para el campo de la MIV. Estos desafíos definen las actuales líneas de investigación, cuyo propósito es el obtener ovocitos en la metafase II, siendo estos competentes para el desarrollo y con capacidad para mantener tasas de embarazo comparables a las logradas mediante superovulación y fecundación *in vitro* (Gilchrist y Smitz, 2023). Los tres desafíos referidos por el autor son:

- Los ovocitos de los folículos antrales pequeños no son completamente competentes para el desarrollo.
- Los ovocitos son propensos a la maduración precoz espontánea una vez extraídos del folículo.
- Los ovocitos madurados *in vitro* no están expuestos a la cascada ovulatoria completa que induce la maduración de los ovocitos *in vivo*.

2.14. Cámara de incubación: condiciones del cultivo

Las condiciones de incubación de los ovocitos bovinos son fundamentales para una maduración exitosa, en este sentido, estudios han señalado que ciertos factores influyen significativamente en los resultados de los procesos de maduración y fertilización *in vitro*. Según Wei y colaboradores, (2022), los ovocitos bovinos deben cultivarse a 39 °C en un 5% de CO₂ para una maduración y fertilización óptimas, asimismo, menciona que las temperaturas más bajas (37 °C) y los niveles de CO₂ (2,5%) disminuyen las tasas de fertilización. En este

mismo contexto, Şen y Kuran, (2018) indican que la incubación a 36,5 °C favorece la maduración nuclear sin afectar negativamente al desarrollo embrionario.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Durante el proceso experimental se utilizó diversos insumos, materiales de laboratorio, equipos y reactivos, que se detallan a continuación:

3.1.1. Material de laboratorio

– Cajas Petri	– Pinzas quirúrgicas
– Cajas estériles para cultivo celular	– Tijeras quirúrgicas
– Espátula	– Puntas estériles
– Luna de reloj	– Vasos de precipitado
– Micropipeta (10-100 y 100-1000 μ L)	– Varillas
– Jeringuilla de 20 ml con bisel de 1-1/5	

3.1.2. Equipos de laboratorio

– Placa calentadora	– Mechero
– Baño María	– Cámara de flujo laminar
– Estereomicroscopio	

3.1.3. Reactivos químicos

– Lactato de Ringer	– Gentamicina
– Agua destilada	– Aceite mineral
– TCM-199	– Piruvato de sodio
– Medio comercial suplementado	– Sulfato de gentamicina
– Hidróxido de sodio	– Ácido clorhídrico

– Desinfectante / alcohol	
---------------------------	--

3.1.4. Material biológico

– Ovarios	– Suero fetal bovino
– Líquido folicular	– Hormona FSH

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Nivel de investigación

El estudio se enmarca en un nivel descriptivo-explicativo (Guevara-Alban et al., 2020). Descriptivo debido a que se documentará las características y resultados obtenidos durante el proceso de MIV de ovocitos bovinos mediante un medio experimental, y explicativo, ya que se buscará entender como las modificaciones en los componentes del medio influyen en las tasas de maduración, calidad ovocitaria y costos operativos.

3.2.2. Diseño de investigación

El diseño de la investigación será de tipo experimental e inductivo (Gamage, 2025), con el cual se buscará comparar la eficiencia de maduración in vitro de ovocitos bovinos utilizando un medio experimental frente a un medio comercial. Los experimentos se realizarán en condiciones controladas en un laboratorio de biotecnología reproductiva.

3.2.3. Diseño del experimento

Se estructuró un diseño experimental completamente aleatorio con dos tratamientos y seis réplicas por tratamiento. Según Festing, (2020), este tipo de diseño es apropiado cuando se

busca evaluar el efecto de los tratamientos sin la influencia de factores externos, y considerando que las unidades experimentales son homogéneas.

3.2.3.1. Variables de estudio

Se plantearon las siguientes variables de estudio, las mismas permitieron abordar los objetivos planteados (ver Tabla 1).

Tabla 1. Variables de estudio.

V. Independientes	Dimensiones	Indicadores
Medio comercial	Composición del medio	* Concentraciones propias del medio.
Composición del medio experimental de maduración.	Concentraciones de componentes y hormonas.	* Concentración de hormonas (FSH, LH). * Concentración de suplementos (Suero Fetal Bovino (SFB), piruvato de sodio, sulfato de gentamicina).
V. Dependientes	Dimensiones	Indicadores
Tasa de maduración (%)	Eficiencia de maduración in vitro.	* Porcentaje de ovocitos que alcanzan la maduración completa. * Comparación de la tasa de maduración entre el medio experimental y el comercial.
Costo-beneficio	Evaluación económica del medio de maduración.	* Costo de suplementos utilizados en cada medio. * Relación costo beneficio entre el medio experimental y el comercial.

3.2.3.2. Número de tratamientos y réplicas

Se diseñaron 2 tratamientos (A y B) con 6 réplicas cada uno, conformando un total de 12 unidades experimentales. Cada replica estuvo conformada por 10 ovocitos dispuestos en cada pocillo de una caja estéril para cultivo celular (4 pocillos por placa), sumando un total de 60 ovocitos por tratamiento y 120 ovocitos en todo el experimento (ver Tabla 2).

Se detalla lo siguiente:

- **A** (medio experimental): ovocitos cultivados en un medio de composición ajustada.
- **B** (medio comercial): ovocitos cultivados en un medio comercial disponible en el mercado.

Tabla 2. Diseño del experimento.

Experimento	Tratamiento	Réplicas	Ovocitos por réplica	Total, de ovocitos
E1	A	6	10	60
E2	B	6	10	60
Total		12	-	120

3.2.4. Experimentación de laboratorio

La fase experimental en laboratorio se realizó basado en el diseño previamente establecido, considerando las condiciones adecuadas de laboratorio. A continuación, se expone detalladamente el protocolo empleado durante el desarrollo del experimento.

3.2.4.1. Recolección y transporte de ovarios bovinos

Los ovocitos bovinos fueron obtenidos en el camal municipal de la ciudad de Cuenca de hembras sacrificadas (ver Anexo 4). En este contexto, Velarde-Choque y Gandarillas-Espezúa, (2019) afirman que la recolección de ovarios de vacas sacrificadas en el matadero proporciona una fuente accesible y económica de ovocitos que provienen de animales en diversas fases del ciclo estral.

En la recolección de ovarios se consideró los criterios señalados por Espín-Vargas, (2018) y Lismanto Syaiful y colaboradores, (2024). Se recolectaron 16 ovarios bovinos dentro de los primeros 30 minutos posteriores al sacrificio (ver Figura 5). El transporte de los ovarios consistió en la colocación de estos en un termo (volumen 500 ml) que contenía una solución de lactato de Ringer y gentamicina (0,36 ml/l) temperado a 30°C, hasta llegar al laboratorio. Es importante señalar que el intervalo de tiempo entre la recolección de los ovarios y el inicio del cultivo de los ovocitos estuvo dentro de las 2 a 3 horas, según lo señalado por Lismanto Syaiful y colaboradores, (2024).

La recolección de los ovarios se llevó a cabo el día lunes (12/05/2025), miércoles (14/05/2025) y viernes (16/05/2025), considerando los criterios señalados previamente, evitando el deterioro de los ovarios durante el proceso.



Figura 5. Ovarios bovinos. **Fuente:** Autores

3.2.4.2. Desinfección de laboratorio

La desinfección del laboratorio es fundamental para garantizar condiciones seguras para el desarrollo del experimento. En este sentido se tomó en cuenta las directrices brindadas por

la Organización Mundial de Salud (OMS, 2005) establecidas en el “Manual de Bioseguridad en Laboratorio”.

3.2.4.3. Preparación de insumos de laboratorio

Se dispuso de insumos como: Solución de lactato de Ringer, medio de cultivo comercial, medio de cultivo experimental, medio TCM 199 y aceite mineral.

Previo al ingreso de los ovarios al laboratorio, es menester disponer anticipadamente todos los insumos y equipos de laboratorio. Se inició encendiendo la incubadora a una temperatura de 38°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Seguidamente se puso en funcionamiento el baño maría donde se logró temperar por 2 horas a 38°C la solución de Lactato de Ringer, el medio de cultivo comercial, el medio experimental, el medio TCM-199 y el aceite mineral, previo a su uso en el proceso de cultivo.

3.2.4.3.1. Preparación del medio experimental

Se preparó un medio de maduración, siguiendo lo establecido en protocolos de varios estudios (Carazas-Loayza, 2018; Espín-Vargas, 2018; Quispe-Gutierrez et al., 2019), pero con ciertas modificaciones en la composición, con el fin de optimizar el proceso de maduración y evaluar la eficiencia entre el medio experimental y el medio comercial. A continuación, se expone el proceso:

- Se utilizó 9 ml del medio TCM-199.
- Se incorporó suero fetal bovino (1 ml) mezclando suavemente para evitar la formación de espuma.
- Se incorporó piruvato de sodio (50 µl) mezclando suavemente para su completa disolución.

- Para evitar la contaminación bacteriana se incorporó sulfato de gentamicina (5 μ L) mezclando correctamente (Alvarado-Capó et al., 2006).
- Se añadió hormona folículo estimulante (FSH) (3 mg) y hormona luteinizante (LH) (3 mg) a 1 ml de solución salina taponada con fosfato de Dulbecco (PBS) que contenga 1 mg/ml de albumina de suero bovino.
- Se homogeneizó con cuidado, se dividió en alícuotas de 20 μ l y se almacenó congelada a -20°C .
- Se verificó que el pH del medio esté en 7,4.

3.2.4.3.2. Medio comercial

El medio comercial que se utilizó en este estudio es el denominado “medio esencial mínimo (MEM)”. El mismo está suplementado con folltropin, ovidrel, estradiol, cisteamina, gentamicina, suero bovino, albúmina bovina, ácido hialurónico, insulina-transferrina-selenio (ITS) y factor de crecimiento epidérmico (EGF).

3.2.4.4. Lavado de ovarios

Una vez recibidos los ovarios en el laboratorio se procedió a colocarlos en un vaso de precipitación de 600 ml (ver Figura 6) que contenía la solución de transporte (lactato de Ringer suplementado con gentamicina). Seguidamente, se llevó a cabo el lavado de los ovarios eliminando restos de sangre y tejidos conectivos adheridos. Además, con la ayuda de pinzas y tijeras quirúrgicas estériles se retiraron las membranas residuales externas. Todo este procedimiento asegura la limpieza de los ovarios previo a la recuperación de los ovocitos por Lismanto Syaiful y colaboradores, (2024).



Figura 6. Lavado de ovarios. **Fuente:** Autores

3.2.4.5. Extracción del líquido folicular de ovarios

Luego del lavado, se procedió a la extracción del líquido folicular de cada ovario, el mismo que fue dispuesto en cajas Petri estériles. Se realizó la aspiración del contenido folicular mediante una jeringa con aguja biselada (1-1/2”), mediante punciones evitando realizar incisiones, esta técnica permitió recuperar mayor cantidad de ovocitos y en muchos casos, de mejor calidad (ver Figura 7). Es importante tener en cuenta que no todos los ovocitos recolectados presentan las características idóneas para completar la maduración in vitro (Espín-Vargas, 2018).



Figura 7. Recuperación de ovocitos. **Fuente:** Autores

3.2.4.6. Selección y lavado de ovocitos

Una vez obtenidos los ovocitos fueron clasificados con base en criterios morfológicos, específicamente según la apariencia de las células del cúmulo y del citoplasma. Esta evaluación permitió identificar aquellos ovocitos con mayor potencial de maduración *in vitro* (Carazas-Loayza, 2018).

Leibfried y First, (1979) citado en Maldonado-Castro, (2020), propusieron un sistema de clasificación basado en la apariencia de las células del cúmulo y del citoplasma. De acuerdo con este enfoque, los ovocitos se agruparon en cuatro categorías distintas según el estado y disposición de las células del cúmulo que los rodea:

- **Categoría 1 (Bueno):** Ovocitos completamente rodeados por tres capas compactas de células de cúmulo.
- **Categoría 2 (Regular):** Rodeados parcialmente por tres capas compactas.
- **Categoría 3 (Malo):** Rodeados por células del cúmulo expandidas.
- **Categoría 4 (Degenerado):** Ovocitos sin cúmulo.

La selección de ovocitos viables se lo realizó con la ayuda de un estereomicroscopio (ver Figura 8). Se procedió a extraer los ovocitos con la ayuda de una micropipeta, y transferidos a otra caja Petri para su posterior lavado. Para el lavado de los ovocitos se utilizó el medio TCM 199, el mismo fue dispensado en cajas Petri, con volumen aproximado de 2 ml y previamente temperado a 38°C.

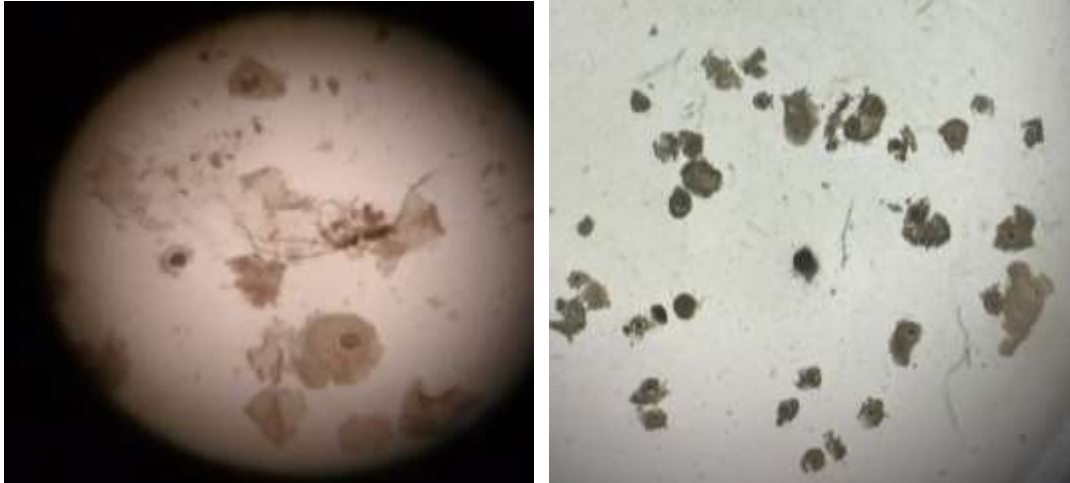


Figura 8. Recuperación de ovocitos. **Fuente:** Autores

3.2.4.7. Inoculación de ovocitos

En esta fase se inició con la esterilización del área en la campana de flujo laminar, rociando etanol al 70% sobre las superficies y permitiendo su secado. Posteriormente, se preparó cajas estériles para cultivo celular con su respectiva rotulación (ver Figura 9).

En cada pocillo de la caja se colocó 75 μ l de medio de maduración (medio experimental y comercial) previamente temperado a 38°C, y cubierto con aceite mineral estéril para evitar la evaporación, asegurando no sobrellenarlas para permitir el equilibrio gaseoso. Seguidamente se procede a inocular los ovocitos (10 ovocitos en cada pocillo), cuyas cajas se incubaron a 38°C con 5% de CO₂ y alta humedad durante 24 horas (Espín-Vargas, 2018).

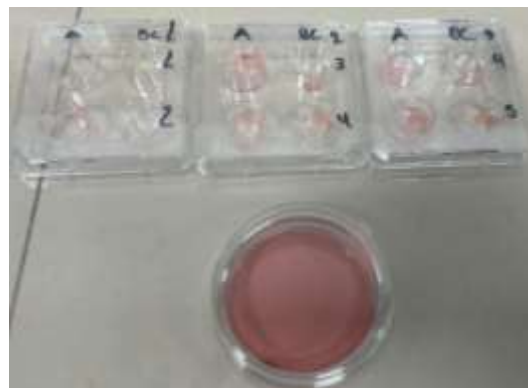


Figura 9. Ovocitos inoculados. **Fuente:** Autores

3.2.5. Evaluación de los ovocitos

La maduración de los ovocitos se evaluó mediante características morfológicas como tamaño, color y apariencia del cumulo. Según lo recomendado por Quispe-Gutierrez y colaboradores, (2019) se examinó mediante un estereoscópico para registrar cambios en la transparencia o pigmentación del citoplasma y la expansión del cúmulo, considerando la dispersión de sus células como indicador de maduración.

3.2.6. Población y muestra

La población del estudio estuvo conformada por todos los ovocitos bovinos potencialmente recuperables de ovarios de vacas sacrificadas en el camal municipal de la ciudad de Cuenca durante el período del experimento.

Se aplicó un muestreo intencional o por conveniencia, el cual, según Hernández-González, (2021), consistió en seleccionar muestras basadas en criterios específicos y en la disponibilidad de recursos. En este estudio, en lugar de seleccionar ovocitos al azar, la muestra estuvo compuesta por un número determinado de ovocitos viables seleccionados según criterios de calidad morfológica, que fueron sometidos al proceso de maduración in vitro utilizando tanto el medio experimental como el comercial.

3.2.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se consideró las siguientes técnicas de recolección de datos:

- **Observación directa en laboratorio:** Permite registrar visualmente el estado y la evolución de los ovocitos durante el proceso de maduración in vitro.

- **Microscopía óptica:** Se utiliza para observar morfológicamente los ovocitos antes, durante y después del cultivo. Además, permite evaluar criterios como: presencia de cúmulos, expansión del cúmulo, extrusión del primer cuerpo polar (indicador de maduración).
- **Registro fotográfico digital:** Para documentar el estado morfológico de los ovocitos en distintos momentos del proceso.
- **Recolección de datos experimentales en hojas de observación o bitácoras:** Permite registrar la cantidad de ovocitos sembrados, porcentaje de maduración, tiempo de incubación, tipo de medio usado, entre otros.

3.2.8. Análisis estadístico

Los datos recolectados durante el proceso experimental fueron registrados en hojas de cálculo de Microsoft Excel previo a procesamiento estadístico. Se evaluó la tasa de maduración *in vitro* de los ovocitos en ambos grupos (medio experimental y medio comercial). Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico R. Preliminarmente, se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y de Fisher, respectivamente, fundamental para determinar la validez del uso de pruebas paramétricas. Se aplicó pruebas de comparación de proporciones como la prueba de chi-cuadrado (χ^2), y un T-student paramétrico para identificar diferencias significativas entre los porcentajes de maduración en los dos grupos de tratamiento, considerando un nivel de significancia del 5%. Adicionalmente, se reportaron gráficas estadísticas para una mejor visualización e interpretación de los resultados.

3.2.9. Análisis económico

El análisis económico estuvo conformado por la eficiencia técnica experimental, la eficiencia económica unitaria y el análisis de relación costo beneficio (Jiang y Marggraf, 2021). Es importante señalar que en este apartado solamente se consideró los gastos asociados a los medios de maduración utilizados, ya que los gastos para transporte, lavado e insumos adicionales (como materiales o reactivos usados en el proceso) son iguales tanto para el medio experimental y el comercial por lo que no afectan la comparación entre ellos.

3.2.9.1. Eficiencia técnica experimental

La eficiencia técnica del experimento se determinó mediante el cálculo porcentual de ovocitos que lograron madurar en cada grupo experimental con relación a su total. Este cálculo permitió evaluar la capacidad de respuesta del medio aplicado (experimental y comercial) para inducir la maduración de ovocitos.

$$\text{Eficiencia técnica (\%)} = \left(\frac{\text{Número de ovocitos maduros}}{\text{Total de ovocitos tratados}} \right) * 100 \quad (1)$$

3.2.9.2. Eficiencia económica unitaria

La determinación de la eficiencia económica unitaria permitió observar el costo por cada ovocito maduro, cuya relación se expresó mediante el costo total del tratamiento entre el total de ovocitos maduros obtenidos. Esta relación permitió comparar la opción económicamente viable en función de los medios de maduración aplicados.

$$\text{Costo por ovocito maduro} = \frac{\text{Costo total del tratamiento}}{\text{Total de ovocitos maduros}} \quad (2)$$

3.2.9.3. Análisis relación costo/beneficio

El análisis de la relación costo/beneficio permitió determinar el número de ovocitos maduros que se podría obtener por cada dólar invertido en el tratamiento. De esta forma se evaluó la eficiencia técnica ajustada al costo, proporcionando información valiosa sobre el rendimiento económico por unidad monetaria, permitiendo establecer cuál de los dos tratamientos representa la opción viable desde el punto de vista económico-productivo.

$$\text{Relación } C/B = \frac{\text{Número total de ovocitos maduros}}{\text{Costo total del tratamiento}} \quad (3)$$

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

En la presente sección se expone los resultados obtenidos del experimento realizado, donde se detallan las observaciones relacionadas con el desarrollo de ovocitos considerando el medio experimental y el medio comercial evaluado.

4.1.1. Maduración de ovocitos

La Tabla 3 y Figura 10 presenta la cantidad de ovocitos madurados considerando que cada réplica experimental estuvo conformada por 10 ovocitos (ver Anexo 3).

Para el medio experimental, los ovocitos maduros estuvieron en un rango que osciló entre 6 y 10 unidades, lo que resulta en una media de $8,0 \pm 1,41$ ovocitos madurados. En el caso del medio comercial, se observó que la cantidad de ovocitos maduros también estuvo en un rango entre 6 y 10 unidades dando como producto una media de $8,0 \pm 1,67$ (ver Tabla 3).

Tabla 3. Ovocitos madurados por réplica.

Maduración de ovocitos – Medio experimental	
Réplica	Número de ovocitos madurados /10
A1	8
A2	8
A3	7
A4	6
A5	9
A6	10
Media	$8,0 \pm 1,41$
Maduración de ovocitos – Medio comercial	
B1	7
B2	8
B3	7
B4	6
B5	10
B6	10
Media	$8,0 \pm 1,67$

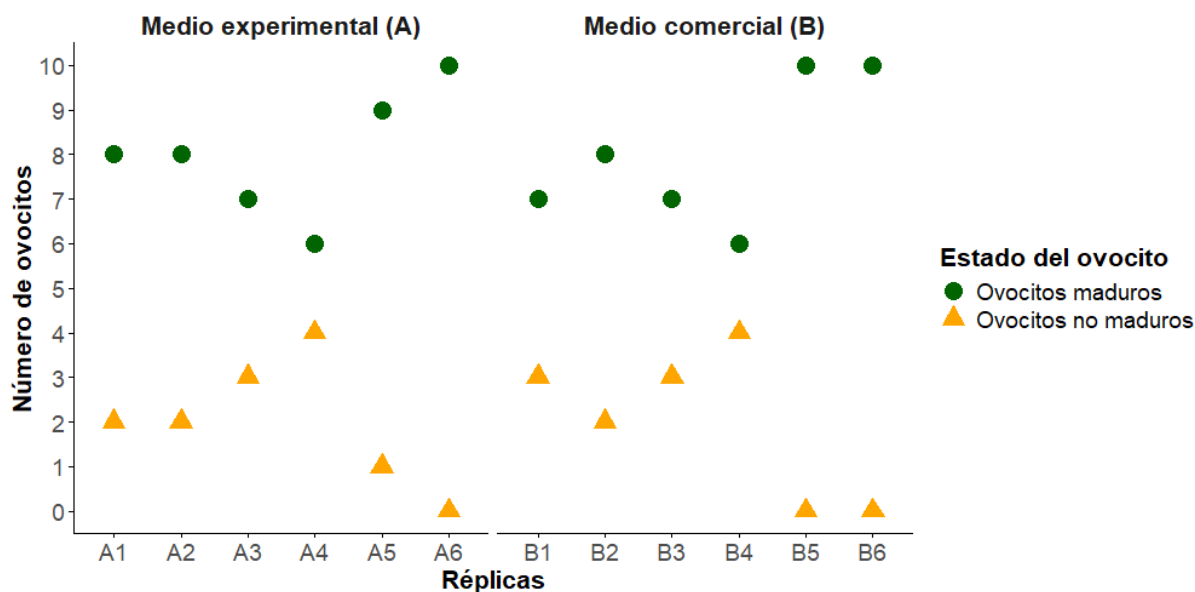


Figura 10. Distribución del número de ovocitos maduros y no maduros por réplica.

Fuente: Autores

4.1.2. Prueba Chi-cuadrado

La prueba Chi-cuadrado aplicada no evidenció diferencias significativas entre los dos grupos de datos correspondiente al medio experimental y comercial ($\chi^2(1) = 0,0; p = 1,0$). Este resultado indica que los dos medios de maduración tienen un comportamiento similar en términos de eficiencia de maduración (ver Tabla 4).

Tabla 4. Resultado de la prueba Chi-cuadrado.

Prueba estadística	X ²	p-valor
Chi-cuadrado	0,0	1,0

4.1.3. Prueba T-student

Los grupos de datos presentan normalidad (p-valor > 0.05) y homogeneidad de varianzas (p-valor > 0.05), por lo que fue conveniente la aplicación de una prueba T-student paramétrico para la comparación de medias (ver Tabla 5).

Tabla 5. Resultado de la prueba de Shapiro-Wilk y Prueba F.

Prueba estadística	Ovocitos maduros	p-Valor
Shapiro-Wilk	Medio experimental	0,96
	Medio comercial	0,2518
Prueba F	-	0,72

La prueba T-student corrobora el resultado de la prueba Chi-cuadrado, dejando en evidencia la ausencia de una diferencia significativa en los grupos de datos estudiados (p-valor > 0.05) (ver Tabla 6).

Tabla 6. Resultado de la prueba T-student.

Prueba estadística	p-Valor
T-student	1,0 (IC 95%) = [-1.992908, 1.992908]

Ambos grupos experimentales reportaron una baja variabilidad en la maduración de ovocitos, sugiriendo una respuesta relativamente uniforme en cada tratamiento (ver Tabla 7).

Tabla 7. Coeficiente de variación.

Grupo ovocitos maduros
A = 17.68%
B = 20.92%

En la siguiente gráfica de cajas (Figura 11), se compara el número de ovocitos maduros tomando en consideración los dos medios de maduración (experimental y comercial). En ambos grupos no se observan valores atípicos, y se puede distinguir que presentan un número similar de ovocitos maduros en términos de la media y mediana. Sin embargo, el medio comercial muestra una ligera mayor dispersión de los datos, tal como lo expresa su caja con un rango más amplio.

Evidentemente, con el análisis observado, no se aprecia una diferencia notable entre los dos grupos de datos, lo cual está en concordancia con los resultados estadísticos previos ($p > 0,05$).

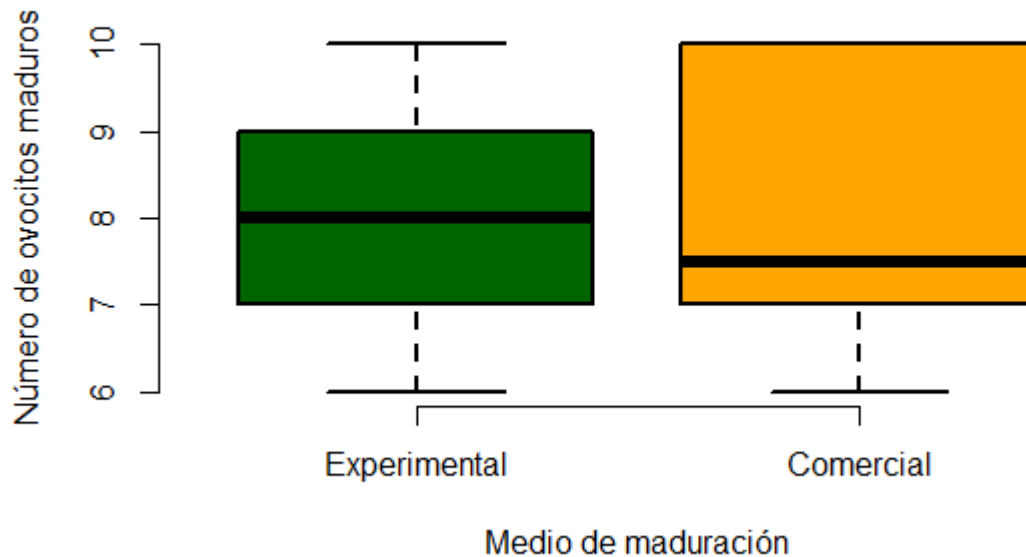


Figura 11. Distribución del número de ovocitos maduros en los dos medios de maduración. La línea horizontal en cada caja representa la mediana; los límites inferior y superior de las cajas indican el rango intercuartílico (Q1 y Q3); y los extremos de las líneas (bigotes) muestran los valores mínimo y máximo. **Fuente:** Autores

4.1.4. Calidad de los ovocitos

En la Figura 12 se aprecia una buena calidad de los cúmulo-ovocito, mostrándose densos y bien organizados. Las estructuras se presentan uniformes y esféricas, cuyo color y textura se observan homogéneas.

Los ovocitos presentaron una variabilidad considerable en los parámetros morfométricos evidenciando un amplio rango de tamaños y formas. Se registraron áreas en un

rango de 9.296 y 433.662.094 μm^2 , asimismo, el perímetro osciló entre 341,789 y 2.334,429 μm , y en cuanto al diámetro, este estuvo en un rango de 112,638 y 743,072 μm (ver Figura 12).

En el Anexo 1 se puede apreciar un amplio collage donde se expone evidencia visual del desarrollo alcanzado de los ovocitos durante el proceso experimental.

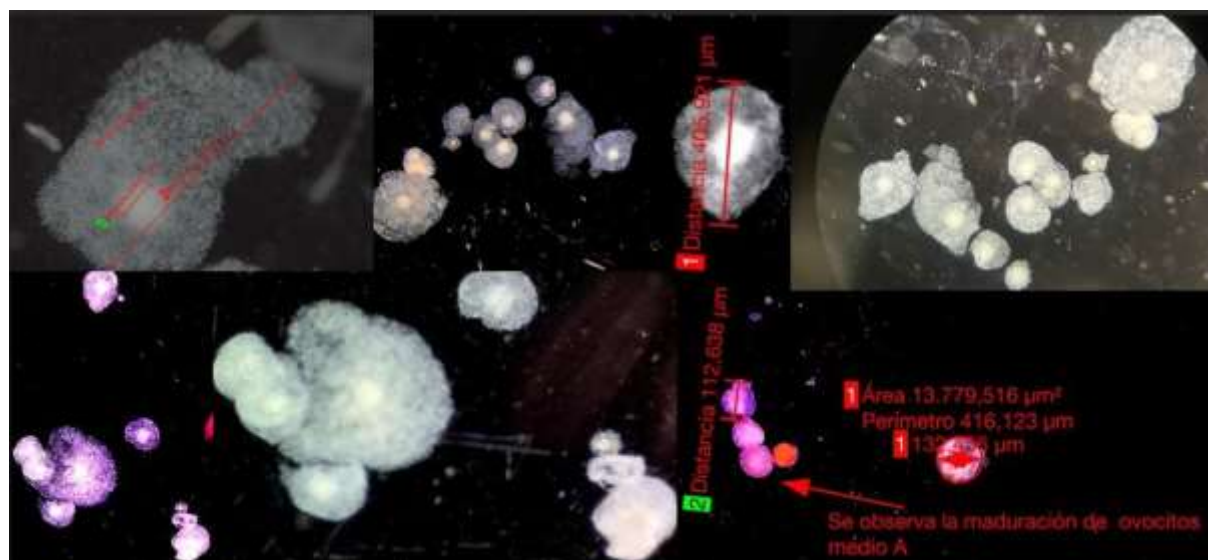


Figura 12. Calidad de ovocitos maduros. Se aprecia múltiples ovocitos en diferentes campos microscópicos. **Fuente:** Autores.

4.1.5. Análisis económico

El costo asociado al medio de maduración experimental fue de 0,89 USD, mientras que para el medio comercial ascendió a 3,60 USD (ver Tabla 8; Anexo 2). Este resultado refleja que el medio experimental es significativamente más económico que el comercial, sugiriendo un ahorro importante en el proceso de maduración de ovocitos.

Tabla 8. Detalle del costo por tratamiento y datos de experimentación.

Parámetro	Detalle	
	Medio experimental	Medio comercial
Costo total del tratamiento	\$0,89	\$3,60
Número de réplicas	6	6
Ovocitos por réplica	10	10
Total de ovocitos tratados	60	60
Promedio de ovocitos maduros	8 por réplica	8 por réplica
Total ovocitos maduros	48	48

Los dos medios mostraron una eficiencia técnica experimental del 80% (ver Tabla 9), indicando que la tasa de maduración de ovocitos fue la misma en ambos tratamientos, tal como lo corrobora el análisis estadístico en la sección 4.1.1.

El costo por ovocito maduro con el medio experimental fue de 0,0185 USD, valor considerablemente menor frente al medio comercial, cuyo costo por ovocito fue de 0,075 USD. Además, el análisis de la relación costo-beneficio indicó que el medio experimental presenta una relación aproximada de 53 ovocitos maduros por dólar invertido, mientras que el medio comercial 13 ovocitos. Estos resultados exponen que el medio experimental presenta una mayor rentabilidad frente al medio comercial, generando de esta forma un mayor retorno (ver Tabla 9).

Tabla 9. Resultado del análisis económico.

Parámetro	Detalle	
	Medio experimental	Medio comercial
Eficiencia técnica experimental	80 %	80 %
Eficiencia económica unitaria	\$0,0185/ovocito maduro	\$0,075/ovocito maduro
Relación costo-beneficio	≈ 53/dólar	≈ 13/dólar

4.2. DISCUSIÓN

El protocolo aplicado en el presente estudio, donde se utilizó un medio de maduración comercial y uno experimental ajustado permitió analizar resultados de factibilidad y la respuesta de maduración de cada uno de estos. Según Ferronato y colaboradores, (2023), la MIV es una técnica utilizada como alternativa a numerosos problemas reproductivos, y es responsable de una gran parte de los embriones bovinos producidos mediante técnicas de reproducción asistida. Sin embargo Fuentes y colaboradores, (2022) resaltan que, a pesar de su relevancia, se presentan algunas limitaciones (económicas y viabilidad de maduración) que deben superarse surgiendo la necesidad de buscar nuevas perspectivas que contribuyan positivamente al cultivo in vitro de ovocitos y embriones.

En esta propuesta de investigación, el medio de maduración experimental estuvo compuesto por TCM-199, suero fetal bovino (SFB), piruvato de sodio, sulfato de gentamicina hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) fosfato de Dulbecco (PBS) y albumina de suero bovino. Según varios estudios (Daoed y colaboradores, 2014; Rahman y colaboradores, 2018; Singha y colaboradores, 2015) se ha demostrado que el medio TCM 199 favorece la MIV de los ovocitos bovinos, especialmente cuando se mejora con SFB. Tal es el caso de estudio de Baishya y colaboradores, (2020) quienes indican que en su experimento el medio TCM 199 suplementado con SFB mejoró significativamente las tasas de maduración alcanzando un 70,33 en comparación con el 55,81 en el grupo de control sin SFB.

En este mismo contexto, en el estudio de Arias y colaboradores, (2022) se demuestra que las gonadotropinas son esenciales para la inducción de la maduración in vitro de los ovocitos bovinos; su experimento se basó en eliminar estas hormonas del medio de maduración, cuyos resultados evidenciaron una tasa de maduración menor incluso con presencia de factores de crecimiento. Asimismo, Widayati y Pangestu, (2020) concluyen en su estudio que la

suplementación con FSH y LH mejoran significativamente la maduración, dando como resultado ovocitos maduros para el futuro desarrollo de embriones *in vitro*. En síntesis, los suplementos incluidos en el medio de experimentación propuesto respaldan su viabilidad como alternativa eficaz para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.

Para el medio de maduración experimental y comercial, el número de ovocitos maduros oscilaron entre 6 y 10 unidades, y un promedio de 8 unidades en todo el experimento, lo que se traduce en una eficiencia técnica experimental del 80% para ambos medios de maduración. Estos resultados evaluados estadísticamente mediante pruebas Chi-cuadrado y un T-student no evidenciaron una diferencia significativa entre los dos grupos de estudio (p-valor >0.05).

Estos hallazgos son consistentes con el estudio de Duarte-da-Fonseca y colaboradores, (2022) quienes, en condiciones experimentales óptimas, obtuvieron una tasa de maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos cercana al 90%. De la misma forma con el estudio de Şirin y Kuran, (2021) quienes reportaron una tasa de maduración del 78% utilizando medio de maduración TCM 199 con jalea real, y un 77% de SFB. Otro estudio es el de Satrio y colaboradores, (2022), quienes suplementaron el medio de maduración con sericina obtuvieron ovocitos maduros (estadio MII) en una tasa que oscila entre el 75,3 % y el 87 %.

Ante lo mencionado previamente, el medio de maduración experimental ajustado en este estudio ha demostrado ser viable con una eficiencia en la tasa de maduración similar al medio comercial, y además este desempeño es consistente en reportes experimentales de varias investigaciones. Estos resultados confirman la eficacia del medio experimental propuesto, posicionándose como una opción válida contribuyendo significativamente al desarrollo de metodologías accesibles y eficientes.

Por otro lado, se observó cúmulo-ovocito densos y bien organizados, cuyas estructuras se presentaron uniformes y esféricas con color y texturas homogéneas. Se evidenció además un amplio rango de tamaños y formas con diámetros que oscilaron entre 112,638 y 743,072 μm . Este rango de variación es importante, considerando que este permite determinar el grado de madurez y la posible competencia de desarrollo de los ovocitos.

Al relacionar los resultados de este estudio con lo reportado por Otoi y colaboradores, (1997) y Blanco y colaboradores, (2011), se demuestra una visible semejanza entre el diámetro ovocitario. Los autores determinaron que los ovocitos con un diámetro $\geq 115 \mu\text{m}$ presentaban mayores tasas de maduración nuclear, mientras que el desarrollo hasta blastocito se alcanzaba en ovocitos $\geq 120 \mu\text{m}$. Asimismo, Águila y colaboradores, (2020), mencionan en base a sus resultados que un diámetro $\geq 120 \mu\text{m}$, un citoplasma oscuro y la presencia de un primer cuerpo polar redondo y liso se han asociado con un mejor desarrollo embrionario. En este contexto, de los ovocitos evaluados en este estudio, un gran porcentaje se encuentran por encima de este umbral crítico de tamaño, lo cual deja en evidencia su potencia madurativa y que a su vez explica la elevada tasa de maduración adquirida (80%).

Los ovocitos reportados en este estudio con diámetros de hasta 743 μm podrían ser posiblemente una respuesta mediciones que incluyeron estructuras anexas o quizá a ovocitos degenerativos o atípicos. Sin embargo, los ovocitos que constituyen el rango crítico de diámetro son especialmente relevantes.

El costo asociado al medio de maduración experimental fue de 0,89 USD, mientras que para el medio comercial ascendió a 3,60 USD. Esto corresponde a un costo por ovocito maduro de 0,0185 USD y 0,075 USD respectivamente. Estos resultados evidencian que el medio experimental es significativamente más económico que el comercial, sugiriendo un ahorro

importante en el proceso de maduración de ovocitos, y además considerando que se obtuvo una tasa de maduración igual al 80% en los medios aplicados. Es menester señalar que, se ha notado una ausencia de estudios enfocados en los detalles del costo económico de los medios de maduración, en este sentido, el presente estudio ofrece información valiosa en cuanto a la eficiencia técnica-económica para la optimización de recursos en biotecnología reproductiva.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Se consiguió la implementación de un protocolo experimental, el mismo que consistió en el acondicionamiento de un medio alternativo, con el cual se logró obtener condiciones adecuadas para la maduración de los ovocitos, obteniendo cúmulos densos y bien organizados. La combinación en cantidades acertadas del medio TCM-199, suero fetal bovino, piruvato de sodio, sulfato de gentamicina hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) fosfato de Dulbecco (PBS) y albumina de suero bovino, fueron clave en el desarrollo de esta propuesta.

El análisis estadístico mediante la prueba Chi-cuadrado y t-student no mostró una diferencia significativa entre los dos grupos de estudio, considerando que ambos medios de maduración (experimental y comercial) alcanzaron una eficiencia técnica experimental del 80%. En consecuencia, se concluye que el medio de maduración experimental presenta un desempeño similar al comercial, en cuanto a idoneidad para inducir la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.

El examen económico dejó en evidencia que el medio de maduración experimental presenta un costo menor (0,89 USD en total y 0,0185 USD / ovocito maduro) en comparación con el medio comercial (3,60 USD en total y 0,075 USD /ovocito maduro). Además, el análisis de la relación costo-beneficio indica que el medio experimental presenta una mayor rentabilidad frente al medio comercial, generando de esta forma un mayor retorno de inversión.

5.2. RECOMENDACIONES

Es importante continuar optimizando los protocolos ya establecidos para el proceso de maduración de ovocitos, explorando así, la incorporación de otros suplementos que permitan lograr la obtención de una mejora aun mayor en la calidad del ovocito maduro.

El número de réplicas y la muestra de ovocitos podría ampliarse para contemplar una mayor robustez estadística, con lo cual se podría detectar posibles diferencias sutiles entre los grupos de estudio.

Se sugiere profundizar en el análisis costo-beneficio en escalas mayores (producción comercial o ganadera) para contrastar si el ahorro observado a escala de laboratorio se mantiene en condiciones reales de uso.

Es importante señalar que el objetivo central de esta investigación se basó en la maduración de ovocitos bovinos, y aunque esta fase constituye un indicador aceptado de madurez, no necesariamente manifiesta la competencia citoplasmática del ovocito ni su capacidad para desarrollarse hasta el estadio de embrión. En este sentido, se recomienda que futuros estudios incluyan parámetros complementarios a fin de obtener una visión completa sobre la eficacia estricta de los medios de maduración empleados.

REFERENCIAS

- Águila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte Selection for In Vitro Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
- Alcantara da Silva, J. V., Ispada, J., Nociti, R. P., da Fonseca Junior, A. M., de Lima, C. B., dos Santos, E. C., Chiaratti, M. R., & Milazzotto, M. P. (2024). The central role of pyruvate metabolism on the epigenetic maturation and transcriptional profile of bovine oocytes. *Reproduction*, *167*(4). <https://doi.org/10.1530/REP-23-0181>
- Alvarado-Capó, Y., Portal González, N., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., & Pérez, B. (2006). Empleo de Sulfato de gentamicina para el control de Pantoea agglomerans, contaminante de la multiplicación in vitro de Solanum tuberosum L cv. Desirée. *Biotecnología Vegetal*, *6*(7), 207–2011. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/422/391>
- Arias, M. E., Vargas, T., Gallardo, V., Águila, L., & Felmer, R. (2022). Simple and Efficient Chemically Defined In Vitro Maturation and Embryo Culture System for Bovine Embryos. *Animals*, *12*(21), 3057. <https://doi.org/10.3390/ani12213057>
- Asimaki, K., Vazakidou, P., van Tol, H. T. A., Oei, C. H. Y., Modder, E. A., van Duursen, M. B. M., & Gadella, B. M. (2022). Bovine In Vitro Oocyte Maturation and Embryo Production Used as a Model for Testing Endocrine Disrupting Chemicals Eliciting Female Reproductive Toxicity With Diethylstilbestrol as a Showcase Compound. *Frontiers in Toxicology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.811285>

- Bahrami, M., & Cottee, P. A. (2022). Culture conditions for in vitro maturation of oocytes – A review. *Reproduction and Breeding*, 2(2), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.repbre.2022.04.001>
- Baishya, D., Bora, A., Goswami, J., Baruah, A., Dutta, D., Barman, Dr. C., & Tamuly, S. (2020). Effect of fetal bovine serum on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(5), 2187–2191. <https://doi.org/10.22271/j.ento.2020.v8.i5ad.7802>
- Behera, B. K. (2023). Feed for living cells/cell lines for biologics. In *Conceptual Development of Industrial Biotechnology for Commercial Production of Vaccines and Biopharmaceuticals* (pp. 143–168). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18748-3.00008-1>
- Blanco, M. R., Demyda, S., Moreno-Millán, M., & Genero, E. (2011). Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6(7), 155–165. <http://www.academicjournals.org/BMBR>
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34, 100622. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Bosch, P. (2023). Morphological and Functional Characterization of Cow Oocytes for Assisted Reproduction Techniques. *Corpus Journal of Dairy and Veterinary Science (CJDVS)*, 4(3), 1–6. <https://doi.org/10.54026/CJDVS1059>
- Carazas-Loayza, K. E. (2018). *Evaluación de dos medios para la maduración de ovocitos in vitro en ganado bovino (Bous taurus) en condiciones de altura* [Universidad Mayor de San Andrés]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/20534>

- Caycedo-Lozano, L., Corrales-Ramírez, L. C., & Trujillo-Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Cívico-Vallejos, Y., Hernández-Dacruz, B., & Cívico-Vallejos, S. (2022). Selección de embriones en los tratamientos de fecundación in vitro. *Clínica e Investigación En Ginecología y Obstetricia*, 49(1), 100709. <https://doi.org/10.1016/j.gine.2021.100709>
- Contreras-Jeronimo, Y. L. (2023). *Maduración in vitro de ovocitos bovinos a diferentes tiempos y colectados de folículos de diferente tamaño en condiciones de sierra - 2021* [Universidad Peruana de los Andes]. <https://hdl.handle.net/20.500.12848/6154>
- Cortés-Escobar, M. de los Á., Gómez-López, D. L., & Martínez Rocha, J. F. (2024). *Conceptos generales de selección de oocitos bovinos a nivel de campo*. Engormix. <https://lc.cx/9Fi48d>
- Daoed, D. M., Ngadiyono, N., & Widayati, D. T. (2014). Pengaruh Suplementasi Fetal Calf Serum Terhadap Kemampuan Maturasi in vitro Oosit Sapi. *Buletin Peternakan*, 37(3), 136. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v37i3.3077>
- Duarte-da-Fonseca, S., Palmeira-de-Oliveira, A., Rolo, J., Gomes-Ruivo, P., Hélio Oliani, A., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, J., & Pinto-de-Andrade, L. (2022). Parameters influencing the maturation of bovine oocyte: a review. *Animal Production Science*, 62(8), 751–764. <https://doi.org/10.1071/AN21380>
- Espín-Vargas, P. S. (2018). *Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16502>

- Fan, L., Sun, W., Zou, Y., Xu, Q., Zeng, R.-C., & Tian, J. (2022). Enhanced corrosion resistance, antibacterial activity and biocompatibility of gentamicin-montmorillonite coating on Mg alloy-in vitro and in vivo studies. *Journal of Materials Science & Technology*, *111*, 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2021.08.089>
- 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>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, *14*(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Ferronato, G. de A., dos Santos, C. M., Rosa, P. M. da S., Bridi, A., Perecin, F., Meirelles, F. V., Sangalli, J. R., & da Silveira, J. C. (2023). Bovine in vitro oocyte maturation and embryo culture in liquid marbles 3D culture system. *PLOS ONE*, *18*(4), e0284809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284809>
- Festing, M. F. W. (2020). The “completely randomised” and the “randomised block” are the only experimental designs suitable for widespread use in pre-clinical research. *Scientific Reports*, *10*(1), 17577. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74538-3>
- Fuentes, F., Muñoz, E., Contreras, M. J., Arias, M. E., & Felmer, R. (2022). Bovine ICSI: limiting factors, strategies to improve its efficiency and alternative approaches. *Zygote*, *30*(6), 749–767. <https://doi.org/10.1017/S0967199422000296>

- Gamage, A. N. K. K. (2025). Research Design, Philosophy, and Quantitative Approaches in Scientific Research Methodology. *Scholars Journal of Engineering and Technology*, 13(02), 91–103. <https://doi.org/10.36347/sjet.2025.v13i02.004>
- 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>
- Gu, Y., Li, X., & Chan, E. C. Y. (2023). Risk assessment of cultured meat. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.037>
- Guevara-Alban, G. P., Verdesoto-Arguello, A. E., & Castro-Molina, N. E. (2020). Metodologías de investigación educativa (descriptivas, experimentales, participativas, y de investigación-acción). *RECIMUNDO*, 3(4), 163–173. [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(3\).julio.2020.163-173](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(3).julio.2020.163-173)
- Hernández-González, O. (2021). Aproximación a los distintos tipos de muestreo no probabilístico que existen. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 37(3). <https://lc.cx/IBxIya>
- Jiang, W., & Marggraf, R. (2021). The origin of cost–benefit analysis: a comparative view of France and the United States. *Cost Effectiveness and Resource Allocation*, 19(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12962-021-00330-3>
- Lino-Magaña, A. A., & Chasi-Olivares, B. E. (2021). *Efecto de dos medios de maduración sobre la producción de embriones partenogénéticos en bovinos* [Tesis, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7048>

- Lismanto Syaiful, F., Jaswandi, J., Mundana, M., & Udin, Z. (2024). The Effect of using HEPES in Culture Medium on Oocyte Maturation Rates and In vitro Fertilization in Pesisir Cattle. *Journal of Animal Health and Production*, 12(3). <https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2024/12.3.450.457>
- Maldonado-Castro, G. A. (2020). *Pasantía en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid* [Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia]. <https://repositorio.uptc.edu.co/items/6320c5cc-ee45-46db-931e-b95b91e979ff>
- Mancheno-Herrera, C. A., Campoverde-Santos, D. K., Mancheno-Neira, P. A., & Llerena-Zambrano, J. C. (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>
- Mejía-Flores, I., Hernández-Ignacio, J., Chiquete-Félix, N., Cornejo-Cortez, M. Á., & Lammoglia-Villagómez, M. Á. (2023). Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos bovinos por la presencia del primer cuerpo polar y la tinción de hoechst. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 10(2), 135–146. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v10i2.436>
- Molina-Pinto, S. A. (2023). *Actualización en producción de embriones bovinos in vitro con medios libres de suero fetal* [Tesis de pregrado, Universidad Cooperativa de Colombia]. <https://hdl.handle.net/20.500.12494/54180>
- OMS. (2005). *Manual de Bioseguridad en Laboratorio* (3rd ed.). Organización Mundial de la Salud. <https://medicina.udd.cl/files/2013/07/3.-Manual-de-Bioseguridad-OMS.pdf>

- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S., & Suzuki, T. (1997). Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology*, *48*(5), 769–774. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00300-2)
- Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, the S. of R. B. and T. and the S. for A. R. T. (2021). In vitro maturation: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, *115*(2), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.11.018>
- Preciado-Gutiérrez, F. J., Masuoka-Ito, D., Barrera-Bernal, J. L., Martín del Campo-Téllez, B. I., Esparza-Villalpando, V., & Ramírez-Orozco, R. E. (2023). Caracterización del suero bovino fetal proveniente de la industria cárnica mexicana en el cultivo celular. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *14*(2), 277–291. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i2.6277>
- Quispe-Gutierrez, U. S., Huanca-Mamani, T., & Olivera-Marochó, L. V. (2019). Influencia de las hormonas folículo estimulante, luteinizante y gonadotropina coriónica equina en la maduración in vitro de ovocitos y clivaje de embriones de alpaca. *Revista de Investigaciones*, *8*(1), 974–985. <https://doi.org/10.26788/riepg.v8i1.774>
- Rahman, M. M., Morshed, S. N. M., Juyean, N. S., & Bhuyian, M. M. U. (2018). Determination of an Effective Media and ITS hormone and Protein supplementation for in vitro Maturation of Oocytes of Indigenous Zebu Cows. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, *16*(1), 45–51. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v16i1.37373>
- Reis Silva, R., Aloísio Scalla Vulcani, V., Sousa Camargos, A., Rabelo da Costa, U., Monteiro Dutra, M., & Renato Chiari, J. (2017). Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte. *COLLOQUIUM AGRARIAE*, *13*(Especial 2), 402–415. <https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244>

- Rodríguez Suástegui, J. L. (2012). *Evaluación del desarrollo embrionario in vitro en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial* [Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa]. <https://doi.org/10.24275/uami.j38607103>
- Roelen, B. A. J. (2020). Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 98. <https://doi.org/10.1071/RD19255>
- Satrio, F. A., Karja, N. W. K., Setiadi, M. A., Kaiin, E. M., Gunawan, M., Memili, E., & Purwantara, B. (2022). Improved Maturation Rate of Bovine Oocytes Following Sericin Supplementation in Collection and Maturation Media. *Tropical Animal Science Journal*, 45(1), 24–29. <https://doi.org/10.5398/tasj.2022.45.1.24>
- Şen, U., & Kuran, M. (2018). Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(6), 827–834. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0569>
- Shilpa Doultani, Prachi Sharma, SP Patil, LB George, & HN Highland. (2024). Unveiling maturation biomarker dynamics: A comprehensive review on In Vitro embryo production in cattle. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 21(1), 579–585. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2024.21.1.2677>
- Silva, A. F. B., Lima, L. F., Morais, A. N. P., Lienou, L. L., Watanabe, Y. F., Joaquim, D. C., Morais, S. M., Alves, D. R., Pereira, A. F., Santos, A. C., Alves, B. G., Padilha, D. M. M., Gastal, E. L., & Figueiredo, J. R. (2022). Oocyte in vitro maturation with eugenol improves the medium antioxidant capacity and total cell number per blastocyst. *Theriogenology*, 192, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.024>
- Singha, J. K., Bhuiyan, M. M. U., Rahman, M. M., & Bari, F. Y. (2015). Comparison of Culture Media for in vitro Maturation of Oocytes of Indigenous Zebu Cows in Bangladesh.

Journal of Animal Reproduction and Biotechnology, 30(4), 327–333.
<https://doi.org/10.12750/JET.2015.30.4.327>

Şirin, E., & Kuran, M. (2021). In vitro maturation of bovine oocytes may using royal jelly as protein source in the culture media. *Large Animal Review*, 27(3), 135–141.
<https://www.largeanimalreview.com/index.php/lar/article/view/231/133>

Sithole, S. M., Sithole, S. M., Mphaphathi, M. L., Mphaphathi, M. L., Sebopela, M. D., Sebopela, M. D., Nedambale, T. L., & Nedambale, T. L. (2023). Comparison of in vitro Maturation Media on Cattle Oocytes after in vitro Embryo Production. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 18(1), 27–39.
<https://doi.org/10.3844/ajavsp.2023.27.39>

Sjunnesson, Y. (2020). In vitro fertilisation in domestic mammals—a brief overview. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 125(2), 68–76.
<https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1697911>

Strauss, J. F., & Williams, C. J. (2019). Ovarian Life Cycle. In *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology* (pp. 167-205.e9). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>

Tinoco, L., Capa Mora, E. D., & Carrera, R. (2024). Efecto de dos medios de capacitación espermática (B.O vs Percoll) en la fecundación in vitro de ovocitos bovinos. *Revista Veterinaria*, 35(1), 48–55. <https://doi.org/10.30972/vet.3517479>

Tur-Kaspa, T., Lambe-Steinmiller, J., Trowbridge, D., Levrant, S., Zoneraich, N., & Zhang, J. X. (2024). Oocyte maturity rate is an age-independent predictor of blastocyst development and euploidy rates: a multicenter retrospective study. *Journal of IVF-Worldwide*, 2(4).
<https://doi.org/10.46989/001c.125350>

- Velarde-Choque, N., & Gandarillas-Espezúa, D. (2019). Recuperación de ovocitos recolectados de vacas criollas post mórtem del sur del Perú. *Ciencia & Desarrollo*, 9, 133–134. <https://doi.org/10.33326/26176033.2005.9.186>
- Wei, Y., Idrees, M., Sidrat, T., Joo, M., Xu, L., Ko, J., & Kong, I. (2022). BOEC–Exo Addition Promotes In Vitro Maturation of Bovine Oocyte and Enhances the Developmental Competence of Early Embryos. *Animals*, 12(4), 424. <https://doi.org/10.3390/ani12040424>
- Widayati, D. T., & Pangestu, M. (2020). Effect of follicle-stimulating hormone on Bligon goat oocyte maturation and embryonic development post in vitro fertilization. *Veterinary World*, 13(11), 2443–2446. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2443-2446>
- Wrenzycki, C. (2018). In Vitro Production of (Farm) Animal Embryos. In *Animal Biotechnology 1* (pp. 269–304). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_12

ANEXOS

Anexo 1. Evidencia fotográfica



Collage: 1-4: ovarios, lavado y extracción de líquido folicular; **5-8:** selección de ovocitos; **9-12:** inoculación de ovocitos en medio de maduración e incubación; **13-19:** observación microscópica de ovocitos maduros. **Fuente:** Autores

Anexo 2. Gastos de experimentación

Insumo Recurso	Cantidad comprada	Cantidad utilizada	Costo por cantidad utilizada (\$)	Costo total (\$)
Transporte y lavado de ovarios				
Lactato de Ringer	5 L	1 L	1.15	5.75
Gentamicina	6 unidades	0.35 ml	0.35	6
Agua destilada	1 gal	1 gal	8	8
Reactivo				
Aceite mineral	150 µl	150 µl	3	3
Preparación del medio y proceso de maduración (medio experimental)				
TCM -199	20 ml	9 ml	13.50	30
Suero fetal bovino	1 ml	1 ml	3.50	3.50
Piruvato de sodio	5 ml	55 µl	0.165	15
Foltropin- v	80 µl	10 µl	2.50	20
Sulfato de gentamicina	2 ml	5 µl	0.0025	1
Hidróxido de sodio	11	20 u µl	0.0005	26
Ácido clorhídrico	11	20 µl	0.0006	32
Total		10 ml	19.70	
		450 µl	0.89	
Preparación del medio y proceso de maduración (medio comercial)				
Medio comercial (MEM) + suplemento (foltropin, Ovidrel, Estradiol, Cisteamina, Suevo bovino, Albumina bovina, Ácido hialuronato, ITS, EGF)	10 ml	450 µl	3.60	80

Anexo 3. Hoja de laboratorio

Réplica	Total, COCs obtenidos	COC 1	COC 2	COC 3	COC 4	Tratamiento aplicado	Ovocitos utilizados	Ovocitos maduros	Ovocitos no maduros	Observaciones
METODO EXPERIMENTAL										
A1	24	8	10	4	2	Experimental	10	8	2	
A2	22	7	9	4	2	Experimental	10	8	2	
A3	26	6	12	6	2	Experimental	10	7	3	
A4	20	5	10	3	2	Experimental	10	6	4	
A5	25	9	10	4	2	Experimental	10	9	1	
A6	28	10	12	4	2	Experimental	10	10	0	
Total								48		
METODO COMERCIAL										
B1	23	7	10	4	2	Comercial	10	7	3	
B2	21	6	10	3	2	Comercial	10	8	2	
B3	24	8	10	4	2	Comercial	10	7	3	
B4	20	5	10	3	2	Comercial	10	6	4	
B5	25	9	10	4	2	Comercial	10	10	0	
B6	27	10	12	3	2	Comercial	10	10	0	
Total								48		
Total	305	90	125	50	24		120	96	24	

Día de recolección de ovarios	Número de ovarios recolectados	Total, de ovocitos recuperados	Total, de ovocitos viables
Lunes	23	200	100
Miércoles	16	120	100
Viernes	24	210	105

Anexo 4. Permiso EMURPLAG - EP



Cuenca, 22 de abril de 2025.

Señor Ingeniero
Juan Pablo Torres
GERENTE DE "EMURPLAG EP"
Su despacho. -

[Handwritten signature]
OF. PRODUCCIÓN
AUTORIZADO
COORDINAR
22/04/25
16:35

De mi consideración:

Reciba un cordial saludo de quienes conformamos la carrera de Biotecnología en la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca. Me es grato dirigirme a usted para solicitarle de la manera más comedida la posibilidad de que los estudiantes Sr. Juan Sebastián Ramírez Robalino con C.I. 0706160538 y Srta. Lourdes del Rocío Orellana Paucar con C.I. 0103698718, puedan acceder a la empresa que acertadamente dirige para recolectar ovarios de reses recién faenadas. Cabe indicar que los estudiantes se registrarán a los reglamentos de EMURPLAG EP y portarán los elementos de protección personal y demás instrumentos que les sean solicitados, en el horario que les sea asignado.

Quedando al pendiente de sus comentarios, le agradezco su gentil atención al presente.

Atentamente,



Dra. Inés Malo Cevallos



DIRECTORA DE CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA - CUENCA

EMURPLAG

22 ABR 2025

14 40 66
RECEPCION DE DOCUMENTOS

celular: 09889952274
correo: juanseb-258@hotmail.com

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

SEDE CUENCA: Calle Vieja 12-30 y Élica Luit • Casilla 2074 • PBX: (593 7) 2862213 Ext: 1329 • Fax: (593 7) 2869112
E-mail: ingbiotecnologiacue@ups.edu.ec • <http://www.ups.edu.ec> • Cuenca - Ecuador