

DOI: <https://doi.org/10.56124/allpa.v8i16.0124>

Calidad ovocitaria y su relación en la producción de embriones bovinos In vitro

Oocyte quality and its relationship with in vitro bovine embryo production

Vilela-Velásquez Luis Javier ¹; Aguilar-Camba Sergio Paúl ²

¹ Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manual Félix López. Calceta, Ecuador.
Correo: luis_vilela_mmv@espam.edu.ec. ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-0380-360X>

² Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manual Félix López. Calceta, Ecuador.
Correo: spaguilar@espam.edu.ec. ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0008-2430-6078>

Resumen

La producción de embriones bovinos in vitro es una técnica clave para la mejora genética y la multiplicación de animales de alto valor zootécnico. El objetivo de la investigación fue evaluar la calidad ovocitaria y su relación en la producción de embriones bovinos In vitro. Se recolectaron ovarios bovinos en centros de faenamiento, se extrajeron y clasificaron los ovocitos en Grados I, II y III según criterios morfológicos de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones. El cultivo se realizó bajo condiciones controladas, se registraron los parámetros de desarrollo embrionario. La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk indicó que los datos no seguían distribución normal, por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y correlación de Spearman. Los resultados obtenidos muestran que no existieron diferencias significativas entre los grupos de calidad ovocitaria para las variables estudiadas. Sin embargo, se encontraron correlaciones positivas significativas entre maduración y clivaje ($p = 0,716$), clivaje y blastocisto ($p = 0,733$), y blastocisto y eclosión ($p = 0,778$). Estos resultados permiten concluir que el éxito del desarrollo embrionario está más asociado al grado de maduración y división temprana que a la calidad morfológica inicial.

Palabras clave: calidad ovocitaria, producción in vitro, embriones bovinos, clivaje embrionario, tasa de eclosión.

Abstract

In vitro bovine embryo production is a key technique for the genetic improvement and multiplication of animals of high zootechnical value. The objective of this research was to evaluate oocyte quality and its relationship to in vitro bovine embryo production. Bovine ovaries were collected from slaughterhouses, and oocytes were extracted and classified into Grades I, II, and III according to the morphological criteria of the International Society of Embryo Technology. Culture was performed under controlled conditions, and embryonic development parameters were recorded. The Shapiro-Wilk normality test indicated that the data did not follow a normal distribution; therefore, nonparametric Kruskal-Wallis and Spearman correlation tests were applied. The results obtained show that there were no significant differences between oocyte quality groups for the variables studied. However, significant positive correlations were found between maturation and cleavage ($p = 0.716$), cleavage and blastocyst ($p = 0.733$), and blastocyst and hatching ($p = 0.778$). These results suggest that successful embryonic development is more closely associated with the degree of maturation and early cleavage than with initial morphological quality.

Keywords: oocyte quality, in vitro production, bovine embryos, embryo cleavage, hatching rate.

1. Introducción

En la biotecnología reproductiva, la producción de embriones bovinos *in vitro* se ha consolidado con una herramienta estratégica para la mejora genética, la conservación de recursos zootécnicos y la multiplicación acelerada de animales con alto valor zootécnico. Esta técnica de reproducción asistida en bovino ha mostrado un avance significativo en los últimos años (Ferre et al., 2019; Bonilla et al., 2021; Rosete et al., 2021), esta herramienta busca maximizar el número de crías de animales genéticamente superiores y difundir material genético a nivel mundial (González y Romo, 2021). La técnica implica mejoras en el rendimiento en todas las etapas de producción desde la estimulación ovárica, cantidad de ovocitos recuperados, maduración, fertilización, cultivo, congelación, transferencia de embriones y diagnóstico de preñez. (Ferre et al., 2019).

Los ovocitos para producción *in vitro* se pueden obtener mediante aspiración folicular guiada por ecografía de animales vivos o por ovariectomía o aspiración folicular *post mortem* (ovarios derivados del matadero) (Ferré

et al., 2019). La calidad intrínseca y extrínseca del ovocito es uno de los principales factores que afectan la producción de embriones, la identificación precisa de las características y grado predicen que la competencia ovocitaria es de gran interés (Azari et al., 2023). Otros factores externos, pueden afectar al animal donante como la dieta, estrés metabólico, enfermedades y envejecimiento (Azari et al., 2023; Krisher 2004).

Actualmente, se ha investigado la relación íntima entre el ovocito y las células del cúmulo ya que facilitan la comunicación y el transporte de moléculas esenciales entre las células de la granulosa y el ovocito, lo que influye en su viabilidad y característica para entrar a los procesos de producción (Machado et al., 2024).

En base a lo expuesto, las características de los oocitos con los complejos cúmulo-ovocito (COC) cultivados en grupo, secretan factores autocrinos y paracrinos que son claves en el desarrollo y competencia ovocitaria (Argudo et al, 2020). Sin embargo, los ovocitos una vez fertilizados, llegan a la fase embrionaria no escindidos o de

mala calidad también pueden secretar factores inhibidores en el cultivo, lo que afecta negativamente el desarrollo de los blastocistos de buena calidad (Aguila et al., 2023). De ahí, resulta esencial determinar como la clasificación morfológica inicial puede servir de base para predecir el desarrollo embrionario, esto representa un importante aporte para la eficiencia de los laboratorios de fertilización in vitro y para la toma de decisiones en el diseño de programas de mejoramiento genético bovino.

Mediante la presente investigación se pretende evaluar la calidad ovocitaria y su relación en la producción de embriones bovinos In vitro como contribución a la mejora de la tasa de preñez, lo que a su vez permitirá conocer el efecto de cada etapa durante su desarrollo hasta blastocistos y eclosión.

2. Metodología (materiales y métodos)

Enfoque de la investigación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas Bovinas de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López" Esta investigación tiene enfoque cuantitativo, de laboratorio, se evaluó la calidad

ovocitaria y producción de embriones bovinos in vitro. La toma y análisis de datos se realizó mediante procedimientos estandarizados, lo cual permitió establecer relaciones estadísticas entre las variables evaluadas.

Tipo y alcance de la investigación

Es un estudio de tipo descriptivo, correlacional y prospectivo, que tiene como objetivo evaluar la calidad ovocitaria y su relación en la producción de embriones bovinos In vitro como contribución a la mejora de la tasa de preñez. Se describe el comportamiento de variables morfológicas y funcionales de los ovocitos y su relación con la tasa de desarrollo embrionario hasta la fase de blastocito y eclosión.

Al respecto, Morales (2020) señala que la investigación descriptiva se basa en la caracterización de una determinada situación, en la cual se destacan sus elementos esenciales. Hernández et al. (2014) la correlacional "es el tipo de investigación donde se "asocian conceptos o variables, permite predicciones y cuantifican relaciones entre conceptos y variables" (p. 30).

Diseño de investigación

La investigación adoptó un diseño no experimental y transversal ya que no se manipulan las variables de forma deliberada, sino que se observan y analizan tal como ocurren en condiciones controladas de laboratorio. El estudio se realizó en un lapso de tiempo establecido, se recolectaron datos en único momento temporal para su análisis comparativo. A decir de Hernández y Mendoza (2018) en este tipo de diseño se establecen relaciones entre las variables mediante la inferencia y análisis estadístico.

Métodos y técnicas

Se emplearon métodos observacionales y analíticos, los cuales se basaron en la clasificación morfológica de los ovocitos y el monitoreo del desarrollo embrionario. Mediante observación directa bajo un microscopio estereoscópico. La técnica que se utilizó fue la producción in vitro de embriones con procedimientos estandarizados de maduración, fertilización y cultivo embrionario.

Población y muestra

La población de estudio estuvo conformada por ovarios bovinos

recolectados en centros de faenamiento. La muestra fue no probabilística por conveniencia, conformada por todos los ovarios obtenido durante los días establecidos para la recolección, asegurando la viabilidad del material biológico mediante su procedimiento en un lapso no mayor a 2 horas desde la obtención.

Variables de estudio

Variables dependientes: Producción de embriones (Blastocistos) y tasa de eclosión

Tipo: cuantitativa

Conceptualización: El término embrión describe los productos de la fertilización hasta que se completa la organogénesis principal.

Definición operacional: Correlación con calidad y cantidad de oocitos.

Instrumento: Observación-
Estereoscopio

Medida: recuento

Variable independiente: Ovocitos (Grado I, II, III)

Tipo: cuantitativa

Conceptualización: células germinales de origen femenino que se forman en los

ovarios durante un proceso conocido como ovogénesis.

Definición operacional: Recuperación de ovario de centro de faenamiento para la obtención de ovocitos.

Instrumento: Observación-
Estereoscopio

Medida: Calidad (Grados I, II, III).

Procedimiento

Se recolectaron ovarios bovinos de centro de faenamiento para la obtención y selección de oocitos y se clasificaron según su morfología con base al manual de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS). Se procesaron dentro de las 2 h posteriores a la recolección. Los ovarios fueron lavados tres veces en solución salina fisiológica precalentado a (37°C). Los complejos cúmulo ovocito (COC) se aspiraron de folículos de entre 4 y 8 mm de diámetro, se utilizó una aguja de calibre 18G y jeringa de 10 ml sin capuchón, se transfirieron a un tubo de 15 ml con 2,5 ml de medio de lavado. Los COC se cultivaron en grupos de máximo 25 oocitos en tubo 2ml con 500 ul de medio MIV y 300 ul de aceite mineral durante 22 h a 38,8 °C con atmósfera de

5,5% de CO₂ en aire humidificado (Raes et al., 2024).

Para la FIV (Fertilización In vitro) se procedió a preparar placas de 30mm con siete gotas, con medio FIV y aceite mineral se dejó estabilizando overnight, post 22 a 24 horas se inició el proceso de fertilización a 38,0 °C con atmósfera 5,5% de CO₂, se llevó a cabo la fase de descongelación y capacitación espermática con gradiente de percoll para posterior inseminación en cada placa.

Para la CIV (Cultivo In vitro) se preparó placas de 30mm con siete gotas, se cultivarán con medio CIV y aceite mineral, por 24 horas a 38,6 °C con atmósfera de 5,5% CO₂, 5,5% O₂ y 89% de N₂, en esta fase se realizó la denudación de los presuntos cigotos y seleccionaron de acuerdo a la calidad y viabilidad. En el Día 3 se realizó el clivaje y se identificó la cantidad de estructuras divididas con más de cuatro células y se cambió el medio a todas las gotas para mejorar el desarrollo de los blastos. En el Día 5 se realizó la identificación de las mórulas y mórulas compactas, se retiró las estructuras que pararon desarrollo y se cambió de medio CIV para mejorar el metabolismo de los embriones. En el D7

se observaron los primeros blastocistos iniciales, tempranos, expandidos y eclosionados. En el Día 10 se observaron los blastocistos eclosionados por cada placas y grupos correspondiente se contabilizo y se procedió a calcular la tasa de eclosión en el Dia 7 y Día 10.

Análisis estadístico

Primero se realizó un análisis descriptivo donde se calcularon las medias por grupos de calidad ovocitaria. Posteriormente se llevó a cabo la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para $p < 0,05$ y partir del resultado obtenido se realizaron pruebas no paramétricas para el análisis estadístico comparativo entre

grupos: Kruskal-Wallis y un análisis de correlación de Spearman, mediante el uso del paquete estadístico SPSS.

3. Resultados y discusión

Una vez realizada la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para $p < 0,05$, se determinó que las variables en estudio no cumplen con el supuesto de normalidad establecido. Por lo cual se decidió realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, en la que se demostró que la calidad ovocitaria en sus diferentes grados no presentó diferencias significativas en las variables estudiadas (maduración, clivaje, tasa de blastocito y tasa de eclosión) (Tabla 1).

Tabla 1. Calidad ovocitaria y producción de embriones bovinos in vitro

Grupo	Calidad	Maduración	Clivaje	Tasa de Blastocisto D7	Tasa Eclosión D10
G1	I	15,4	12,0	6,5	3,7
G2	II	15,4	11,5	7,0	4,2
G3	III	15,4	9,5	5,5	2,9
p-valor		0,976	0,323	0,868	0,608

Estos resultados demuestran que no existe diferencia significativa entre los grupos de calidad ovocitaria. En cuanto a los indicadores de maduración, clivaje, tasa de Blastocito al día 7 y eclosión embrionaria al día 10. Esta situación difiere de resultados obtenidos por Ferré et al. (2019) quienes registraron mayor

competencia embrionaria en ovocitos de grado I, lo cual puede estar dado por las condiciones del sistema in vitro utilizado o por el origen de del material extraído. Pero a la vez concuerdan con resultados reportados por Nawaz et a. (2021) e Iñamagua (2024) que no observaron diferencias significativas.

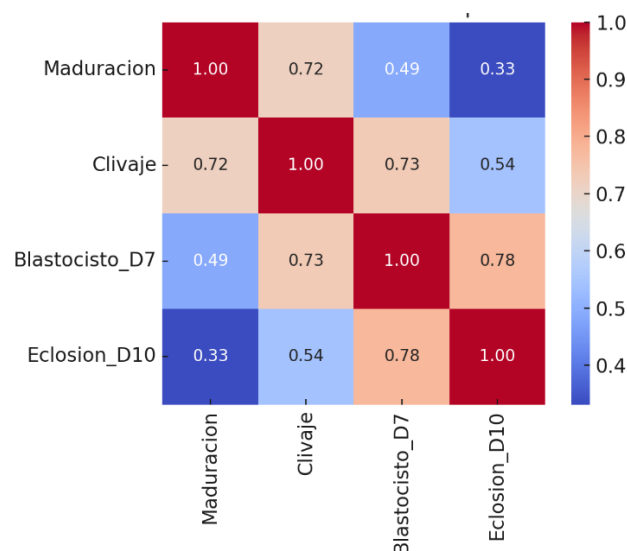
La segunda prueba no paramétrica realizada fue el análisis de correlación de Spearman ($p < 0,001$) (Figura 1.), en el cual se muestran relaciones positivas significativas entre las variables maduración y clivaje ($p=0,716$), clivaje y blastocito ($p=0,733$) y blastocito y eclosión ($p=0,778$). Este resultado permite plantear que a pesar de que la calidad ovocitaria no influyó de manera significativa en el desarrollo embrionario. El grado inicial de maduración y clivaje están relacionados con la producción de embriones y su eclosión.

El hecho de que la maduración y el clivaje estén positivamente correlacionados con el éxito en las etapas embrionarias posteriores, según Lonergan y Fair (2008) depende en su mayor parte de la maduración

ovocitaria, tanto del citoplasma como del núcleo; además, la activación temprana es determinante para alcanzar una buena calidad de blastocisto. Asimismo, se destaca que el número de blastocistos eclosionados está altamente relacionado con los que alcanzaron la etapa de blastocisto en el Día 7, lo cual reafirma la importancia de un ambiente de cultivo adecuado (condiciones físicas y químicas) y la sincronía en el desarrollo embrionario (Gallego et al., 2022).

Lo analizado hasta aquí, subraya la necesidad de incorporar marcadores funcionales complementarios (como evaluación mitocondrial, marcadores de apoptosis o expresión génica) para una mejor selección de ovocitos, especialmente en programas comerciales de fertilización *in vitro*.

Figura 1. Matriz de correlación de Spearman



4. Conclusiones

La calidad ovocitaria, evaluada por morfología, Grados I, II y III, al analizar la maduración, clivaje, formación de blastocisto a D7 y eclosión embrionaria a D10, no presentó diferencias estadísticas significativas, confirmando que este criterio no puede ser utilizado en forma aislada como predictor del potencial de desarrollo de embriones in vitro. También, se detectaron correlaciones positivas y significativas entre maduración-clivaje, clivaje-blastocisto y blastocisto-eclosión, validando la importancia del grado de maduración y la división celular temprana en el éxito del desarrollo embrionario. Los resultados respaldan la incorporación de marcadores funcionales y moleculares en paralelo a la evaluación morfológica.

Bibliografía

Aguila, 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* (Basel). 24;10(12):2196. 10.3390/ani10122196

Amboya Tene, N. I. (2024). Análisis de las consecuencias de la metritis postparto en la producción

lechera. Escuela Superior Politécnica Chimborazo. Riobamba, Ecuador. <https://dspace.esPOCH.edu.ec:8080/server/api/core/bitstreams/9eb5779a-ff7e-443d-94bf-5d171479c7ea/content>

Argudo, D. E., Tenemaza, M. A., Merchán, S. L., Balboa, J. A., Méndez, M. S., Soria, M. E., Galarza, L. R., Ayala, L. E., Hernández Fonseca, H. J., Perea, M. S., & Perea, F. (2020). Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. *Theriogenology* 1, 155, 232-239. 10.1016/j.theriogenology.2020.05.044.

Azari Dolatabad, N., Benedetti, C., Velez, D. A., Montoro, A. F., Sadeghi, H., Residiwati, G., Leroy, J. L., Van Soom, A., & Pascottini, O. B. (2023). Oocyte developmental capacity is influenced by intrinsic ovarian factors in a bovine model for individual embryo production. *Anim Reprod Sci.* 10.1016/j.anireprosci.2022.107185.

Bonilla, L., Bonilla, D., y Gómez, R. (2021). Producción de embriones bovinos del laboratorio INVITRO COLOMBIA durante el año 2019. *Working Papers ECAPMA*, 5(1), 6 – 16.

- <https://doi.org/10.22490/ECAP-MA.4242>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2019). Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. [10.1017/S1751731119002775](https://doi.org/10.1017/S1751731119002775).
- Gallego, F., Mancheno, A., Mena, L., & Murillo, A. (2022). Bovine *in vitro* Embryo Production: State of the Art. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.*, 2(1), 172–185. <https://doi.org/10.18502/espoch.v2i2.11192>
- González Silvestry, F. B., Romo García, S. (2021). Producción de embriones caprinos *In Vitro*: uso de ovocitos vitrificados En: Navarro Maldonado, M del C., Ambríz García, D. A., Vargas Miranda, B., & Trejo Córdova, A. *Reproducción asistida y conservación de mamíferos*. Ediciones del Lirio. México.
- Hernández S., R., Fernández C., C., & Baptista L., M. del P. (2014). *Metodología de la Investigación*. México: Editorial McGraw Hill. <http://observatorio.epacartagena.gov.co/wp-content/uploads/2017/08/metodologia-de-la-investigacion-sexta-edicion.compressed.pdf>
- Hernández, S. R., & Mendoza, C. P. (2018). *Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativas, cualitativas y mixta*. México: Editorial Mc Graw Hill.
- Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82, 13, 14-23. https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE14x
- Loneragan, P., & Fair, T. (2008). *In vitro*-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology*, 69(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>
- Machado AF, Facioni Guimarães SE, Lollobrigida de S Netto D, Guimarães JD, Alves Torres CA, Sanglard LP, Gomez-Leon VE. (2024). Phenotypic and genetic relationships among anogenital distance, anti-Müllerian hormone, and *in vitro* embryo production in Gyr dairy cattle. *J Dairy Sci*. 107(4), 2512- 2523. [10.3168/jds.2023-23497](https://doi.org/10.3168/jds.2023-23497).
- Morales, F. (2020). Conozca 3 tipos de investigación: Descriptiva, Exploratoria y Explicativa. SCRIBD. <https://es.scribd.com/document/370018537/Conozca-3-Tipos-de-Investigacion-Descriptiva-Exploratoria-y-Explicativa>
- Nawaz, M., Saleem, M., Yaseen, M., Sagheer, M., Zahoor, I., Ahmad, N., & Riaz, A. (2021, diciembre

19). La estimulación ovárica mediante FSH mejora la recolección folicular y el rendimiento de blastocistos en Bos Indicus Ganado. Revista veterinaria de Pakistán, 42(1), 17-24.
<http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2021.081>

Rosete Fernández, J. V., Álvarez Gallardo, H., Urbán Duarte, D., Fragoso Islas, A., Asprón Pelayo, M. A., Ríos Utrera, Á., Pérez Reynozo, S., & Torre Sánchez, J. F. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 12(Supl. 3), 39-78. Epub 24 de enero de 2022.<https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>