

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Evaluación de dos protocolos para la vitrificación de
embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro*
utilizando el medio SOF, INIA-Ayacucho

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Presentado por el:

Bach. MEDINA ANDÍA, Emanuel

AYACUCHO-PERÚ

2016

A Dios por darme la fortaleza interior que me impulsa a la realización de mis metas, sin importar los obstáculos que se presenten.

A mis padres Modesto, María y hermanos, por brindarme el apoyo necesario para poder lograr mí sueño de convertirme en un profesional.

A los caminos pedregosos de mi pueblo por donde recorrí muchas veces y a aquellas aves compañeras y testigos de mi infancia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, institución reconocida como el *Alma Mater* de Ayacucho por brindarme su tutela durante mis años de estudiante.

A la Estación Experimental Agraria Canaán - Ayacucho.

Al Blgo. Fidel R. Mujica Lengua, Asesor, por su consejo acertado y apoyo en la redacción de este informe.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores responsable del Programa Nacional de Investigación en Camélidos y Bovinos y al M.V. Mijaíl Contreras Huamaní por compartir sus experiencias, conocimiento y brindarme su amistad y paciencia en las actividades realizadas en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	7
2.3. Etapas de la producción <i>in vitro</i> de embriones	8
2.4. Embriones bovinos	13
2.5. Vacunos	14
2.6. Criopreservación de embriones bovinos	15
2.7. Vitrificación como técnica de criopreservación	17
2.8. Tipos de crioprotectores	21
2.9. Métodos de almacenamiento para embriones vitrificados	22
2.10. Evaluación de la viabilidad	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Ubicación de la zona de estudio	27
3.2. Población	27
3.3. Muestra	27
3.4. Metodología	27
3.5. Análisis de datos	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	51
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Porcentaje de embriones recuperados post desvitrificación	34
Tabla 2. Porcentaje de embriones viables a las 6 horas del cultivo	35
Tabla 3. Porcentaje de embriones viables a las 18 horas del cultivo	36
Tabla 4. Porcentaje de embriones degenerados a las 18 horas post	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Embrión durante vitrificación clásica y ultrarrápida	17
Figura 2. Exposición del embrión a las soluciones de vitrificación	20
Figura 3. Pajilla abierta y estirada (Open Pulled Straw, OPS)	22
Figura 4. Esquema de un Cryoloop	22
Figura 5. Esquema de un Cryotop	23
Figura 6. Esquema de un Fibreplug	23
Figura 7. Esquema de una Pajuela clásica	24
Figura 8. Porcentaje de recuperación del embrión post desvitrificación	38
Figura 9. Porcentaje de embriones viables a las 6 y 18 horas	39
Figura 10. Porcentaje de embriones degenerados a las 6 y 18 horas	40
Figura 11. Embriones bovinos desvitrificados según Von Baer	41
Figura 12. Embriones bovinos desvitrificados según Vajta	42

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Diagrama de la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	60
Anexo 2. Clasificación y evaluación de los complejos cúmulus ovocito	61
Anexo 3. Clasificación de los embriones bovinos por la IETS	62
Anexo 4. Técnica de Percoll	63
Anexo 5. Preparación de solución salina fisiológica	64
Anexo 6. Medios de cultivo SOFaa	65
Anexo 7. Colección, traslado y lavado de ovarios del matadero	67
Anexo 8. Aspiración folicular de ovocitos	69
Anexo 9. Selección y maduración de ovocitos	70
Anexo 10. Fertilización y cultivo de cigotos	71
Anexo 11. Embriones bovinos producidos <i>in vitro</i>	72
Anexo 12. Vitricación de embriones	73
Anexo 13. Desvitrificación de embriones	75
Anexo 14. Soluciones stocks necesarios para preparación de medios	77
Anexo 15. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones bovinos	78
Anexo 16. Equipos de laboratorio biotecnología reproductiva	79
Anexo 17. Prueba T-Student para la vitricación de embriones	82
Anexo 18. Vitricación de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i>	83
Anexo 19. Matriz de consistencia	84

RESUMEN

En el estudio se planteó como objetivos determinar el mejor protocolo para la vitrificación de embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro* utilizando el medio SOF, de igual manera determinar la viabilidad mediante el mantenimiento de re-expansión y calidad morfológica de los embriones bovinos post desvitrificación a las 6 y 18 h de cultivo. Las técnicas de vitrificación ensayadas fueron: 1) Vajta con concentraciones de MM + 7,5% EG + 7,5% DMSO y MM + 16,5% EG + 16,5% DMSO + sucrosa 0,5M como criopreservante, 2) Von Baer con 5% glicerol + 5 % etilenglicol + 0,2 M sucrosa + 10 % Suero fetal bovino + 50 ug/ ml Gentamicina y 20 % Glicerol + 20 % etilenglicol + 0,5 M Sucrosa + 10% Suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina. Se emplearon embriones producidos por fecundación *in vitro* (n: 101, 101 por protocolo). La desvitrificación se efectuó en agua a temperatura de 37 °C/1 min para ambos métodos respectivamente. Se retiraron los crioprotectores en una solución de 1,2 ml de MM + sucrosa 0,25M, 1 ml de MM + sucrosa 0,15M y 800 µl de MM durante 15 min para el primer protocolo y 100 µl de sucrosa 0,5M y sucrosa 0,2M durante 10 min para el segundo protocolo. Luego de desvitrificados, se colocaron en placas de 4 pocillos con microgotas de 200 µl de SOF+10% SFB para el primer protocolo y 200 µl de SOF + 20% de Suero Fetal para el segundo protocolo, para ser cultivados y evaluados morfológicamente. Se evaluó el porcentaje de embriones recuperados al momento de la desvitrificación, porcentaje de embriones viables desvitrificados a las 6 y 18 h del cultivo y el porcentaje de embriones degenerados desvitrificados a las 18 h. En los embriones recuperados al momento de la desvitrificación se encontró que para el primer método se obtuvo un 85,10 % de embriones recuperados y para el segundo un 76,20 %, no existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P>0,05$) para ambas técnicas. En cuanto a la evaluación morfológica el porcentaje de los embriones viables a las 6 h para el protocolo Vajta fue de 27,80 % y para el segundo protocolo Von Baer fue de 49,60 %, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P<0,05$), para ambos protocolos. De igual manera señalar que el porcentaje de embriones viables a las 18 h para Vajta fue de 21,60% y para Von Baer fue de 41,30%, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P<0,05$) Finalmente el porcentaje de embriones degenerados desvitrificados a las 18 h del cultivo, para el primer protocolo se obtuvo un 78,40% de embriones degenerados y para el segundo protocolo un 58,70%, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P<0,05$). En base a los datos obtenidos se concluye que la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* utilizando la técnica de Von Baer fue mejor con respecto al método Vajta, siendo una alternativa a considerar para futuras investigaciones de criopreservación de embriones de vacas genéticamente mejoradas.

Palabras claves: viabilidad, embrión, medios de cultivo, vitrificación y re-expansión.

GLOSARIO DE ABREVIACIONES

KSOMaa	Medio optimizado simple de potasio solución stock
SOFaa	Fluido Oviductal Sintético
CR1aa	Medio Charles Rosenkrans con aminoácidos
HTF	Fluido Tubarico Humano (siglas en inglés)
TCM-199	Medio de Cultivo Tisular 199 (siglas en inglés)
Hepes	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-ácidoetanolsulfónico
TALP/ FIV	Tyrode's albumina- lactato-piruvato
TL	Tyrode's lactato
FSH	Hormona Folículo Estimulante
LH	Hormona Luteinizante
FCS/SFB	Suero Fetal Bovino (siglas en inglés)
BSA	Albumina Sérica Bovina (siglas en inglés)
EAA	Aminoácidos esenciales (siglas en inglés)
NEAA	Aminoácidos no esenciales (siglas en inglés)
AMPc	Adenosina monofosfato-3',5'-cíclico
ZP3	Glicoproteína 3 de la zona pelúcida
PIV	Producción <i>in vitro</i>
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
IETS	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones
PHE	Solución de penicilamina, hipotaurina y epinefrina
PVA	Alcohol polivinílico (siglas en inglés)
PVP-40	Polivinilpirrolidona 40%

I. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de material genético bovino por parte del sector productivo ha impulsado la implementación de biotecnologías que proporcionen una fuente constante de estos recursos. La obtención de embriones por técnicas *in vitro* e *in vivo* ofrece un progreso genético acelerado ya que producen un elevado número de animales de alto valor genético. En nuestro país, se ha incrementado la producción de embriones por técnicas *in vitro* en los últimos años, sin embargo la criopreservación de estos embriones ha sido un factor limitante en la masificación de esta técnica, siendo este uno de los motivos por los cuales los embriones producidos *in vitro* son transferidos en fresco directamente a la receptora.

La criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*, facilita el uso de programas de transferencia de embriones, el establecimiento de bancos de germoplasma con acceso permanente a material genético de un determinado individuo o raza, e igualmente facilita las biotecnologías asociadas como clonación y transgénesis.¹ En materia de criopreservación el desarrollo de tecnologías en la última década ha sido significativo. Una muestra de tales avances lo constituye el campo de la reproducción en donde se ha hecho rutinario abordar el proceso de criopreservación de semen, ovocitos, embriones o tejido gonadal con el fin de satisfacer la demanda cada vez más creciente por los métodos y servicios de la reproducción asistida.² El valor de la criopreservación en la reproducción asistida en bovinos queda claramente ilustrado por el gran número de gametos y embriones que son congelados y transferidos cada año.³

Consecuentemente, esto ha generado la necesidad de la criopreservación de los embriones excedentes de dicha producción. Sin embargo, la criopreservación de esta clase de embriones, por medio de métodos convencionales de

congelamiento, no ha alcanzado tasas de sobrevivencia satisfactorias, lo que ha llevado a la utilización de otros métodos como es la vitrificación.

La vitrificación es una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene los agentes crioprotectores y los ovocitos o embriones con el nitrógeno líquido. La solución vitrificante utilizada posee crioprotectores en alta concentración que al ser enfriados no cristaliza, sino se torna viscosa y pasa del estado líquido al sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de allí su nombre.⁴

No obstante, es importante resaltar, que a pesar del alcance conseguido con estas técnicas hasta hoy, aun es necesario el desarrollo de nuevos métodos de criopreservación y la evaluación de nuevos crioprotectores que puedan ser usados en la vitrificación de embriones y el efecto de estos sobre la viabilidad embrionaria, y desarrollar nuevos protocolos que permitan hacer más eficiente el proceso de criopreservación en términos de la descendencia lograda a partir de embriones criopreservados por este método.³⁶ Se hace necesario por lo tanto contribuir a la búsqueda de un protocolo de criopreservación de embriones y una buena combinación de crioprotectores que permitan mejorar la sobrevivencia embrionaria y las tasas de preñez.⁵

Los objetivos del presente trabajo fueron:

Objetivo general

Evaluar dos protocolos para la vitrificación de embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro* utilizando el medio SOF.

Objetivos específicos

1. Determinar el mejor protocolo de vitrificación para embriones bovinos que permitan mejorar la sobrevivencia embrionaria al final del proceso.
2. Evaluar la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*, mediante el análisis de su morfología y re-expansión post desvitrificación a las 6 y 18 horas del cultivo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

La biotecnología de la reproducción es un conjunto de técnicas que van desde la inseminación artificial, hasta la clonación, todas ellas encaminadas a aumentar la eficiencia reproductiva de los animales con alto valor genético. Siendo la producción de embriones *in vivo* la que dio paso a la producción de embriones *in vitro*, y en su aplicación se incluyeron herramientas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones.⁶

Las biotecnologías surgieron por generaciones. La primera generación fue la inseminación artificial en 1908, luego como segunda generación aparece el control hormonal del estro y la ovulación, la transferencia de embriones y la congelación de gametos a partir de 1970. La tercera generación es el sexado de embriones y espermatozoides y la producción *in vitro* de embriones en 1987. La cuarta generación es la clonación de células somáticas en 1997 y por último aparece como quinta generación la transgénesis en el año 2000.⁷

Los resultados de la producción *in vitro* de embriones en distintas especies fueron mejorando significativamente a medida que avanzaron los conocimientos acerca de sus requerimientos. Para ello fue necesario transformar los medios de cultivos primitivos, muy complejos y suplementados con suero, en medios más definidos a través de los cuales cada uno de sus componentes pudiera ser estudiado en función del impacto que genera en el desarrollo embrionario.⁸

Aunque las tasas de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos son altas y no todos son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto.²⁸ La calidad intrínseca de los ovocitos es el principal factor que afecta el rendimiento de blastocisto, mientras que las condiciones de cultivo de embriones tienen un papel crucial en la determinación de la calidad del blastocisto.⁹

En un estudio realizado por¹⁰, manifiesta que un total de 28 embriones fueron seleccionados para ser vitrificados con el mismo protocolo de vitrificación; pero diferente método de almacenamiento 20 en OPS (71,4%) y 8 en cryolock (28,5%). Los embriones fueron vitrificados en diferentes estados de desarrollo: mórula (8) y blastocisto temprano (11) y blastocisto normal (9). Se creó un grupo control de 28 embriones el cual se dejó en la incubadora en medio CR2aa. Después de la evaluación realizada a las 24 y 48 horas no se observó re-expansión ni eclosión embrionaria en los embriones desvitrificados. En el grupo control se observó expansión en 18 blastocistos (64,2%) a las 12 horas.

Por otra parte¹¹, señalan en su investigación utilizando la técnica del Open Pulled Straw (OPS), 93 blastocistos seleccionados para la vitrificación fueron depositados individual y secuencialmente en las soluciones de vitrificación 1 y 2 consistentes en TCM-199 (20% SFB) adicionado con Etilenglicol y Dimetilsulfóxido (DMSO), por períodos de un minuto y 20 segundos respectivamente. Durante este último período el embrión fue cargado con una micropipeta, en un volumen de 2 µl, depositándose sobre una placa Petri desde la cual fue cargado por capilaridad en la pajuela. El 89% de los blastocistos congelados fueron recuperados post descongelación, de los cuales 54% se encontraban re-expandidos o eclosionados a las 24 horas de cultivo. Al evaluar los embriones a las 72 horas post descongelación se observó un 29% de embriones eclosionados.

En otra investigación realizada por¹², evaluaron la eficiencia de diferentes soluciones de vitrificación para criopreservar blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Para ellos se realizaron evaluaciones mediante cultivo *in vitro*. Se compararon dos soluciones de vitrificación: Propilenglicol + Glicerol (Pg+Gli) y Etilenglicol + Ficoll + Sacarosa (EFS). Se encontraron diferencias significativas en las tasas de desarrollo y eclosión en favor de EFS (56,4 vs 33,3% y 35,4 vs 13,3 %; $P < 0,05$). Luego se compararon tres soluciones de vitrificación: EFS, EFS modificado (EFSm) y Etilenglicol + Glicerol (Eg+Gli). Las soluciones EFSm y Eg+Gli alcanzaron mayores tasas de eclosión que la solución EFS (57,7 vs 59,6 vs 35,7%; $P < 0,05$). Finalmente, la solución Eg+Gli fue evaluada en combinación con diferentes concentraciones de sacarosa. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de desarrollo de las diferentes soluciones, mientras que las tasas de eclosión de la solución Eg+Gli combinada con sacarosa 0,1 M o 0,3 M fueron mayores que la misma solución sin sacarosa o combinada con 0,5 M.

Otra investigación realizada por¹³, con el objetivo de comparar dos métodos de criopreservación, Congelación Lenta (CL) y Vitricación (V) sobre la calidad (morfología y nuclearidad) de embriones bovinos producidos *in vitro*; blastocitos de excelente calidad (90-100 células), fueron criopreservados por CL (77) y V (50) y evaluados por microscopía óptica al descongelamiento y posterior a 12 horas de cultivo. La morfología y la nuclearidad fueron registradas: Compacto, Parcialmente Expandido, Expandido, Picnótico y Fragmentado; <40, 40–60, 61–80 y >80 núcleos. Al descongelamiento los embriones Parcialmente Expandidos se caracterizaron por tener <40 núcleos. Los embriones Compactos y Expandidos presentaron la mayor cantidad de núcleos (61–80;>80). El 57,3% de los embriones presentaron <40 núcleos. El 17,7% de los embriones presentaron más de 60 núcleos. A las 12 horas el 36,6% de los embriones presentó más de 60 núcleos, recuperándose en un 132,7% con el cultivo. No existió diferencia entre las técnicas de criopreservación ($p>0,05$) en ninguna de las fases.

Por otra parte¹⁴, señala en su trabajo de investigación que se vitrificaron 49 blastocitos en CPS recuperándose el 95,91% de los embriones, de los cuales 50% se re expandió a las 24 horas posteriores a la desvitrificación. Se evaluó el número de blastómeras intactas y con membrana plasmática alterada antes y después de la vitricación, obteniéndose una proporción de blastómeras alteradas de 1,12% antes vs. Un 27% después de la vitricación ($p<0,05$). Estos datos sugieren que es factible el uso del método de vitricación en CPS para criopreservar embriones bovinos mestizos producidos *in vitro*.

En una investigación realizada por¹⁵, equilibraron embriones de 7 días en SV al 50% (12,5% EG y 12,5% DMSO + 75% PBS) a temperatura ambiente durante 5 minutos, fueron transferidos a SV al 100% (25% EG y 25% DMSO) a 4 °C durante 20 segundos y posteriormente sumergidos en nitrógeno, obteniendo altas tasas de preñez con blastocistos tempranos.

Por otra parte¹⁶, en su investigación evaluaron la eficiencia de diferentes soluciones de vitricación para criopreservar blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Para ellos se realizaron evaluaciones mediante cultivo *in vitro*. Se compararon dos soluciones de vitricación: Propilenglicol + Glicerol (Pg+Gli) y Etilenglicol + Ficoll + Sacarosa (EFS). Se encontraron diferencias significativas en las tasas de desarrollo y eclosión en favor de EFS (56,4 vs 33,3% y 35,4 vs 13,3 %; $P<0,05$). Luego se compararon tres soluciones de vitricación: EFS, EFS modificado (EFSm) y Etilenglicol + Glicerol (Eg+Gli). Las soluciones EFSm y

Eg+Gli alcanzaron mayores tasas de eclosión que la solución EFS (57,7 vs 59,6 vs 35,7%; $P < 0,05$). Finalmente, la solución Eg+Gli fue evaluada en combinación con diferentes concentraciones de sacarosa. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de desarrollo de las diferentes soluciones, mientras que las tasas de eclosión de la solución Eg+Gli combinada con sacarosa 0,1 M o 0,3 M fueron mayores que la misma solución sin sacarosa combinada con 0,5 M.

En otra investigación realizada por¹⁷, evaluaron la eficiencia de las técnicas de conservación de embriones bovinos por vitrificación (V) o por congelación lenta (CL), sobre la viabilidad post descongelación, utilizando embriones producidos *in vivo* (InVV) e *in vitro* (InVT). Los protocolos de criopreservación ensayados fueron: 1) CL, etilenglicol 1,5 M como criopreservante, 2) V con glicerol 6,5 M + 5% de sacarosa y 3) V con 25% etilenglicol + 25% glicerol. Se emplearon embriones obtenidos InVV por superovulación (n: 90, 30 por cada método), y embriones producidos por fecundación InVT (n: 90, 30 por protocolo). La descongelación en el primer caso (CL), se realizó a temperatura ambiente (22 °C/10 segundos) y luego en agua a 37 °C/10 segundos. La desvitrificación se efectuó en agua a 30 °C/30 segundos y se retiró el crioprotector en una solución 0,5 M de sacarosa + 10% de suero fetal bovino durante 5 minutos. Luego de descongelados, se colocaron en medio TCM-199, en grupos de 10, según los tratamientos para su cultivo y evaluación morfológica. Se evaluó la reconstitución del blastocele, tasa de degeneración a las 12 y 24 h y la eclosión a las 48 y 72 horas post cultivo. En la reconstitución del blastocele encontramos que los tratamientos con embriones InVV y criopreservados por CL, tuvieron una respuesta mayor al 70% (24/30), contrastando con los producidos InVT y V donde los resultados fueron menores al 50% (13/18) defiriendo estadísticamente ($P < 0,05$). Los embriones InVV presentaron una tasa de degeneración embrionaria menor al 30% a las 24 h post cultivo, independientemente del protocolo aplicado; en tanto los obtenidos InVT presentaron tasas entre 35% con CL y 56% para la V. En la eclosión embrionaria se presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$), a las 24 y 48 h, siendo los tratamientos que involucraban embriones InVV los que aportaron mejores resultados (23/30 [76,67%] en CL y 20/30 [66,67%] y 18/30 [60%] en los casos de V, comparados con los de embriones obtenidos InVT (17/30 [56,67%], 9/30 [36,67%] y 12/30 [40%] respectivamente). En base a los datos obtenidos concluimos que los embriones

InVV presentan mayor tolerancia a los procesos de criopreservación ensayados, siendo el protocolo de CL el que aportó los mejores resultados. Otro estudio realizado por¹⁸, compararon la tasa de sobrevivencia y eclosión *in vitro* post descongelación de 60 embriones bovinos criopreservados por curva lenta (CL) o vitrificación. Los embriones criopreservados por curva lenta fueron expuestos a 1,5 M de etilenglicol por 20 min y congelados a una velocidad de 0,5 °C/min hasta - 32°C. La vitrificación se realizó introduciendo los embriones en solución de equilibrio durante 10 min, y después en 4 gotas de solución de vitrificación durante 5, 5, 10 y 10 seg en cada gota, respectivamente, se colocaron en cryotops y se sumergieron en nitrógeno líquido. Posterior a la descongelación, los blastocistos se cultivaron en medio IVC suplementado con 10% SFB durante 72 h a 38,5 °C, en 5% CO₂ y 5% aire. La tasa de sobrevivencia y eclosión fueron evaluadas cada 24 horas. El análisis de Kruskal-Wallis determinó que los embriones vitrificados tuvieron mayor tasa de sobrevivencia a las 24 h (90%) y eclosión (50%) que el método de curva lenta (40,6% y 30% respectivamente; p<0,05). En conclusión, la vitrificación es un mejor método de criopreservación que la CL para embriones bovinos producidos *in vivo*.

Por otra parte⁶⁴, realizó un estudio con el objetivo de evaluar los efectos de la vitrificación de embriones producidos *in vitro* usando etilenglicol EG, dimetilsulfoxido DMSO y dimetilformamida DMF en la morfología de embriones. Así: solución 1 20% EG + 20% DMSO + 0,5M Sacarosa; solución 2 20% DMF + 20% EG + 0,5M Sacarosa y solución 3 20% DF + 20% DMSO + 0,5M Sacarosa Encontrando que los únicos grupos de embriones vitrificados que mostraron re-expansión, fueron aquellos que utilizaron la DMF en la composición de la solución crioprotectora a una concentración de 20%, indicando que esta sustancia puede tener un efecto benéfico en la vitrificación de embriones bovinos, el autor encontró que con la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* con asociaciones de crioprotectores que contengan dimetilformamida se logran las mejores tasas de viabilidad post desvitrificación.

2.2. Producción *in vitro* de embriones bovinos

La producción *in vitro* de embriones bovinos es una técnica empleada en los programas de reproducción bovina y puede llevarse a cabo a partir de ovocitos recuperados de donadoras de alta calidad genética o de ovocitos primarios de vacas de matadero para luego ser madurados en laboratorio.

Los ovocitos maduros son fertilizados con semen congelado previamente capacitado. Una vez fertilizados, los cigotos se desarrollan hasta el estado de blastocisto.¹⁹

2.2.1. Importancia de la producción *in vitro* de embriones

La producción *in vitro* de embriones bovinos es una técnica beneficiosa, que garantiza un elevado número de embriones en el mismo estado de desarrollo permitiendo el mejoramiento genético.²⁰

Otro aspecto que resaltar es la conservación de material genético a través de la criopreservación de gametos y/o embriones fertilizados *in vitro*. De esta forma se genera reservas genéticas de bovinos no solo de animales de alta calidad genética sino que también de criollos o nativos.⁴²

Un ejemplo de la aplicación de la técnica es que ha permitido vencer las limitaciones impuestas por las condiciones del medio cuando se pretende la utilización de razas especializadas en la producción de leche o carne que son superadas parcialmente por los animales heterocigotos por ejemplo los resultantes del cruzamiento del *Bos taurus* x *Bos indicus* para obtener los animales llamados F1, pero que se va perdiendo en las generaciones posteriores. La posibilidad que brinda la fertilización *in vitro* es transferir embriones producidos *in vitro*, ya que siempre se dispondría animales F1 pues se fecundaría *in vitro* ovocitos de vacas cebú con semen de los mejores toros de razas europeas conocidas, el embrión resultante de la fertilización *in vitro* se transferiría a las vacas de ható.²⁰

La producción *in vitro* permite tener una ganancia genética altísima debido a que se hace una selección vía macho y vía hembra.²¹

Otras aplicaciones de la producción de embriones *in vitro* se encuentra el mejoramiento genético con fines productivos, la investigación con fines de conservación y la generación de técnicas de reproducción asistida. Por esta razón la producción de embriones *in vitro* y en especial el modelo bovino ha sido motivo de múltiples investigaciones para mejorar las tasas de producción de blastocistos que siguen siendo variables de 5 a 30 %.²²

2.3. Etapas de la producción *in vitro* de embriones

a. Obtención de ovarios y recolección de ovocitos

Los ovarios se pueden conseguir a partir de dos fuentes: 1) Castración de hembras bovinas. 2) hembras de matadero. La obtención de ovarios después de

la faena es la forma más fácil, común y económica de obtener ovocitos bovinos con fines experimentales o comerciales.²³

Este procedimiento se debe hacer de la forma más higiénica posible, manteniendo una temperatura no menor de 25 grados centígrados. Cuando se mantienen a esta temperatura, pueden permanecer durante 11 horas consecutivas y no disminuye la vitalidad de los ovocitos.²⁴

El transporte de los ovarios puede hacerse en suero fisiológico, con antibióticos o sin ellos, en termos o envases herméticamente sellados. Para la recolección de ovocitos, el método más fácil y simple es la aspiración folicular, con el empleo de cánulas unidas a bombas aspirantes o directamente con jeringas. Se debe tener en cuenta que el folículo debe ser punzado de manera lateral por un costado del folículo, ya que si se hace hacia la mitad se perdería el líquido folicular. El contenido del aspirado folicular se va recolectando en tubos estériles de 10 ml.²⁵

b. Maduración *in vitro* de ovocitos

Esta es la primera etapa dentro de la producción de embriones que establece el punto de partida en la compleja sucesión de cambios químicos, metabólicos y morfológicos que concluirá con el desarrollo del embrión. La característica visible de un ovocito madurado *in vitro* es la expansión de las células del cúmulus, esta se torna laxa y adherente propiedad que le permite ser atrapado por las fimbrias del oviducto y la penetración del espermatozoide en el momento de la fecundación. En cambio un cúmulus no expandido constituye una barrera impenetrable para los espermatozoides durante la fecundación.²⁶

Los ovocitos situados en los folículos ováricos se encuentran en el estadio de diploteno correspondiente a la profase de la primera división meiótica. La prosecución de la meiosis y su maduración final ocurre dentro del folículo preovulatorio bajo el estímulo del pico preovulatorio de la hormona luteinizante e incluye la finalización de dos programas celulares, que transcurren en el núcleo y el citoplasma.²⁷

La presencia de células del cúmulus alrededor del ovocito durante la maduración *in vitro*, es esencial para el desarrollo del mismo, sugiriendo que las células del cúmulus segregan factores solubles que mejoran el desarrollo de competencias del ovocito o remueven los factores que pueden inhibir o suprimir su futuro desarrollo.²⁸

Al producirse la adecuada estimulación de factores de crecimiento y hormonas dan lugar a la progresión de estos ovocitos al estadio de metafase II. Posteriormente, estos quedarán en este estadio de metafase II hasta que se produzca la fecundación.²⁷

Los efectos de la FSH en las células granulosas incluyen la regulación de la síntesis de receptores para la LH, a su vez la LH es indispensable para la maduración del ovocito y reanudación de la meiosis.²⁹

c. Fecundación *in vitro* de ovocitos

Comprende una serie de procesos cuyo punto final está representado por la fusión de los núcleos de ambos gametos y la formación del genoma del nuevo individuo. Para que se concrete dicho evento *in vitro* es necesario que tanto el ovocito madurado sea cultivado con espermatozoides que hayan alcanzado la capacidad fecundante.²⁶

Los ovocitos madurados se clasifican atendiendo dos criterios de madurez: el aspecto morfológico y grado de expansión de células del cúmulus. Esta clasificación subjetiva no siempre corresponde a la madurez nuclear.³⁰

La capacitación espermática es la condición fisiológica que deben cumplir los espermatozoides para adquirir su capacidad fecundante. Ello se da a través de la remoción de los factores descapacitantes, derivadas de las vías genitales masculinas y la interacción de estas células con los llamados factores capacitantes que se encuentran en el tracto genital femenino. Básicamente este mecanismo consiste en cambios en la composición lipoproteica de la membrana espermática, aumento en el metabolismo y de la hipermotilidad del espermatozoide, que involucra un incremento en la motilidad la cual pasa de una motilidad progresiva rectilínea a un patrón de movimientos vigorosos.²⁶

El proceso de capacitación espermática ocurre en la región ístmica del oviducto, los componentes de la superficie espermática son modificados o eliminados por secreción del aparato reproductor femenino lo que desestabiliza la bicapa fosfolipídica y permite la activación acrosomal. Esta última consiste básicamente en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana externa del acrosoma seguida de una vesiculación extensa sobre el segmento anterior del acrosoma. Tanto la fusión y vesiculación del acrosoma da lugar a la liberación de la hialuronidasa y acrosina enzimas hidrolíticas que permiten al espermatozoide digerir y formar un pequeño orificio a través del cual penetrará la zona pelúcida. Es importante señalar además que la capacitación no es igual a

la reacción acrosómica, la cual es un fenómeno de superficie en el espermatozoide y que ocurre solamente cuando este toma contacto con la zona pelúcida.³¹

El espermatozoide tiene que atravesar las barreras presentes en el ovocito entre las que se encuentra las células del cúmulus, la zona pelúcida y la membrana plasmática.²⁶

El método de gradientes de Percoll al 90% y 45% permite homogenizar la motilidad espermática a través de la separación de los espermatozoides más débiles y muertos y solo quedarse con un pellet con los más aptos para la inseminación siendo la concentración de 1×10^9 de espermatozoides /ml. Que permite tener una tasa de fertilidad entre 56,8% y 72,9% de cuatro toros evaluados.³²

La reacción acrosomal puede ocurrir antes o después de la fijación de la cabeza espermática a los receptores glucoproteicos en la zona pelúcida, pero para la fijación es esencial que el gameto tenga el acrosoma intacto. La unión de la cabeza del espermatozoide a ZP3 permite que ocurran interacciones con otros componentes de la zona, los cuales estimulan la activación del acrosoma.³¹

La fecundación básicamente ocurre en dos pasos iniciando por la Penetración del espermatozoide por las diferentes capas celulares que rodean al ovocito y termina con la formación de ambos pronúcleos. Para que tenga lugar la fertilización de los ovocitos, los espermatozoides deben de ser previamente capacitados. La capacitación espermática es la reacción donde son retiradas las glicoproteínas de la membrana del espermatozoide y que le permiten adquirir su capacidad para poder fecundar al ovocito. Durante la capacitación ocurren varios fenómenos: los espermatozoides adquieren hipermotilidad progresiva, capacidad de penetrar el cúmulus y se preparan para que tenga lugar la reacción acrosómica.³³

d. Cultivo *in vitro* de embriones

El cultivo embrionario es la etapa donde los ovocitos fecundados se desarrollan hasta el estadio de blastocisto o blastocisto expandido.

Durante el cultivo embrionario *in vitro* ocurren cuatro eventos importantes en lo que se refiere al desarrollo desde la etapa de cigoto hasta la formación del blastocisto: la primera división embrionaria, cuyo momento de presentación es crítico para el subsecuente desarrollo del embrión, la activación del genoma embrionario en la etapa de 8 a 16 células, la compactación de la mórula en el día

5 y la formación del blastocisto a los días 6 ó 7. Por lo tanto, las condiciones inadecuadas del ambiente de cultivo que pudieran afectar alguno o todos estos eventos podrían tener un efecto deletéreo sobre la calidad del embrión.³⁴

El cultivo es el paso con el cual se concluye la producción de embriones *in vitro*. La composición de las diferentes fórmulas empleadas en el cultivo de estados embrionarios tempranos son relativamente simples, se tratan esencialmente de una solución salina a la cual es suplementada con una fuente de energía (Piruvato, glucosa o lactosa) y una fuente proteica (suero o albumina sérica bovina). Existen medios como el TCM-199 que contienen vitaminas y aminoácidos.²³

Los primeros intentos de cultivar embriones bovinos *in vitro* se encontraron con la dificultad de que los embriones no superaban la etapa de 8 a 16 células, situación denominada "bloqueo del desarrollo" que no implicaba la muerte inmediata del embrión, pero que era irreversible, para evitar este bloqueo se utilizó el co-cultivo con células somáticas o los medios condicionados por dichas células y se suplementaron con suero. Sin embargo, con el tiempo se demostró que la aplicación de estos procedimientos de cultivo generaba diversos inconvenientes.³⁵

Para la elaboración de los medios para el desarrollo embrionario, es importante tener en cuenta los componentes esenciales como son:

Agua: el mayor componente de los medios de cultivo es el agua (>98%) y su calidad tiene sobre el desarrollo de los embriones en cultivo.³⁶

El restante 1 a 2% son iones inorgánicos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, antioxidantes, hormonas y factores de crecimiento.

Aminoácidos y vitaminas: Los medios de cultivo más utilizados, como son el Ham's F-10 o el TCM-199, contienen del orden de 20 aminoácidos. Normalmente los 20 aminoácidos están implicados en la síntesis proteica. Si a los medios de cultivo solamente se les enriquece con una gran cantidad de aminoácidos esenciales, una porción de ellos se degradarán para proveer de una fuente de nitrógeno que sirva para la síntesis de aminoácidos no esenciales. Las vitaminas juegan un importante papel como coenzimas en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos.³⁷

Hormonas: Existe una clara evidencia de que algunas hormonas, como la insulina, tienen un gran efecto sobre el desarrollo de los embriones. La adición de insulina a los medios de cultivo resulta en un incremento de las tasas de

desarrollo morfológico y del transporte de glucosa al blastocisto.³⁸ Hormonas tales como LH, FSH y estradiol, de los medios de maduración de los ovocitos bovinos, se ha demostrado que ofrecen efectos beneficiosos sobre el porcentaje de complejos cúmulo-ovocito (COC) que son capaces de completar la maduración meiótica con el consecuente desarrollo.³⁹

Antibiótico: Los medios de cultivo suelen ser complementado de forma estandarizada por 0,1% de antibióticos para suprimir el crecimiento de microorganismos contaminantes y para prevenir la expansión de patógenos. Aunque no son necesarias altas concentraciones de antibióticos, 10 veces la concentración normal de Penicilina G y de Estreptomicina durante 72 horas se ha visto que no resulta tóxica para los embriones a 37 °C.⁴⁰

Requerimientos fisiológicos: Temperatura 37 °C, pH 7,2 a 7,4 dióxido de carbono 5 %, tensión de oxígeno, osmolaridad y humedad relativa de las incubadoras.⁴¹

2.4. Embriones bovinos

La segmentación o división embrionaria, es un proceso posterior a la fecundación, los cigotos experimentan varias divisiones mitóticas, por ello cada célula hija o blastómero recibe el juego completo de cromosomas. Las segmentaciones iniciales suelen ocurrir simultáneamente en todos los blastómeros, pero la sincronización se pierde inevitablemente y los blastómeros comienzan a dividirse de manera independiente unos de otros. Una vez que el embrión ha formado 9-16 blastómeros, se denomina mórula.³¹

Mórula compacta, es visible a los 5 a 6 días de cultivo, donde el número de blastómeros es de aproximadamente de 32-64. Sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa solo el 60-70% del espacio perivitelino. El blastocisto temprano, es visible a los 7 días, el número de blastómeros es de 100-200 células. Dando la formación de una cavidad llamada blastocele en el interior del embrión. El blastocisto, es visible entre el día 7-8 del cultivo, el número de blastómeros es de 100-200 células. El blastocisto expandido, visible entre el día 7-8 del cultivo, con más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente, con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida. La presión creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión.²⁶ Ver el Anexo N° 15 sobre el desarrollo embrionario *in vitro* en bovinos.

2.4.1. Evaluación embrionaria

La evaluación precisa del embrión es uno de los pasos más importantes para que la transferencia de embriones producidos *in vitro* sea exitosa en las receptoras. Aunque existen muchos métodos alternativos para determinar la viabilidad embrionaria, la evaluación basada en criterios morfológicos continúan siendo la más simple, rápida y confiable. La evaluación morfológica realizada con el estereoscopio es la más utilizada y generalmente se realiza después de la búsqueda y localización de los mismos.²⁶

2.4.2. Código de clasificación

De acuerdo a las normas de la International Embryo Transfer Society (IETS), el código para clasificar la calidad embrionaria basada en la integridad morfológica de los embriones y es de tipo numérica. Los códigos de calidad embrionaria varían de 1 a 4 como se explica en el Anexo N° 03.

2.5. Vacunos

La ganadería bovina en el Perú, es un sector importante en la producción agropecuaria. El 80% del ganado bovino se encuentra mayormente en propiedad de pequeños ganaderos y comunidades campesinas donde predomina el vacuno criollo y sus cruces.⁴²

El 78% del total de ganado lechero está concentrado en la costa donde se practica un sistema de producción estabulado a base principalmente de forraje de corte y suplementario de heno de alfalfa y concentraciones a base de grano y residuos industriales.⁴³

La producción de ganado bovino criollo se localiza en valles interandinos y puna alto andina donde están ampliamente adaptados a las condiciones medio ambientales, en donde razas mejoradas no pueden desarrollarse de manera eficiente. El bovino criollo en el Perú es una población muy heterogénea, con numerosos morfotipos y adaptaciones locales, el 85,8% de los bovinos existentes en el Perú, corresponden a animales sin raza definida, entre los cuales se encuentra el bovino criollo y cruzado. Los diversos ecosistemas a los cuales se ha adaptado, los hacen de gran valor potencial como fuente de genes útiles (genes de resistencia a enfermedades, de rendimiento productivo y reproductivo, etc.).⁴⁴

La aplicación de la biotecnología reproductiva en la región de Ayacucho permite hacer uso eficiente de los recursos ganaderos existentes ya que la crianza de vacunos, básicamente está orientada a la crianza de ganado de doble propósito

como criollos y cruzados cuyos productos principales son carne y leche. Los ganados que más predominan a nivel regional son los cruzados que provienen del criollo con las razas Brown swiss, Holstein y Shorton. Siendo la distribución geográfica de ellos de aproximadamente 80% de ganado Brown swiss cruzado y el resto criollo en la provincia de Huamanga y Cangallo. En la provincia de Parinacochas posee el ganado Brown swiss cruzado, Shorton cruzado y el ganado criollo, tanto que Lucanas posee mayor cantidad de ganado criollo, Brown swiss cruzado. En Huancasancos y Sucre predomina el ganado criollo en ambos casos con más del 90%.⁴⁵

2.6. Criopreservación de embriones bovinos

La criopreservación posibilita almacenar embriones de gran variedad de especies mamíferas sin que se pierda su capacidad de desarrollarse y nacer vivos.⁹ La criopreservación de embriones (particularmente en el sector ganadero) es un método por el cual se permite al ganadero avanzar genéticamente y conseguir animales de mayor pedigrí con menos costos.⁴⁶

El mayor obstáculo para la aplicación comercial de los embriones producidos *in vitro* es la falta de métodos adecuados para su conservación, por ello se ha estudiado con más obstinación los procesos de criopreservación.⁴⁷

Actualmente, los métodos más utilizados para criopreservar embriones son la congelación convencional y la vitrificación. La primera es considerada la técnica de elección para la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vivo*. En este tipo de embriones *in vivo*, la congelación convencional ha permitido obtener resultados ligeramente inferiores (10 %) a los registrados con embriones en fresco.⁴⁸

2.6.1. Tipos de criopreservación de embriones bovinos

En la congelación convencional, ampliamente difundida, los embriones alcanzan su equilibrio osmótico antes de comenzar el descenso de la temperatura lo mantienen durante el enfriamiento. Este, se lleva a cabo lentamente permitiéndole a los embriones contraerse y ceder agua, en respuesta al incremento gradual de la concentración de la solución extracelular. Se han desarrollado otras técnicas en las que se efectúa una deshidratación parcial de los embriones sin que estas alcancen su equilibrio osmótico, ellas son la vitrificación y la congelación ultrarrápida. En la primera, cuya dicha deshidratación ocurre antes del enfriamiento rápido y en la segunda, durante un breve periodo intermedio de exposición de los embriones a temperatura debajo de 0°C.

a. Congelación convencional

En la técnica de congelación lenta o convencional, los principales objetivos son equilibrar las células con los crioprotectores y minimizar la formación de grandes cristales de hielo.⁶⁰ La congelación lenta busca mantener el balance entre la velocidad de enfriamiento (0,2-0,3°C/min), la velocidad de deshidratación, y la velocidad de formación de núcleos de hielo, de manera que se produzca la penetración de un crioprotector en la célula, produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la formación de cristales de hielo.⁶¹

El congelamiento lento es realizado empleando bajas concentraciones de crioprotector y bajas tasas de enfriamiento.

b. Congelación ultrarrápida

Se busca la deshidratación del embrión previa a su congelación, con la diferencia que luego de la exposición al crioprotector los embriones son sumergidos directamente en nitrógeno líquido o previamente expuestos durante unos segundos a vapores y luego sumergidos. No se necesitan sofisticados equipos de congelación, es muy práctica y no requiere de mucho tiempo. La congelación por este método es tan rápida que se forman cristales de hielo intracelular, pero tan pequeña.

c. Vitrificación

Proceso físico mediante el cual la solución de criopreservación, con alta concentración de crioprotectores penetrantes y no penetrantes, y el o los embriones en ella contenidos, alcanzan un estado altamente viscoso debido a un rápido enfriamiento, sin formar cristales de hielo.⁶² Todo el proceso desde el equilibrio hasta la inmersión en nitrógeno líquido (NL) no requiere más de 10 minutos.

El embrión está sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante la descongelación.⁸

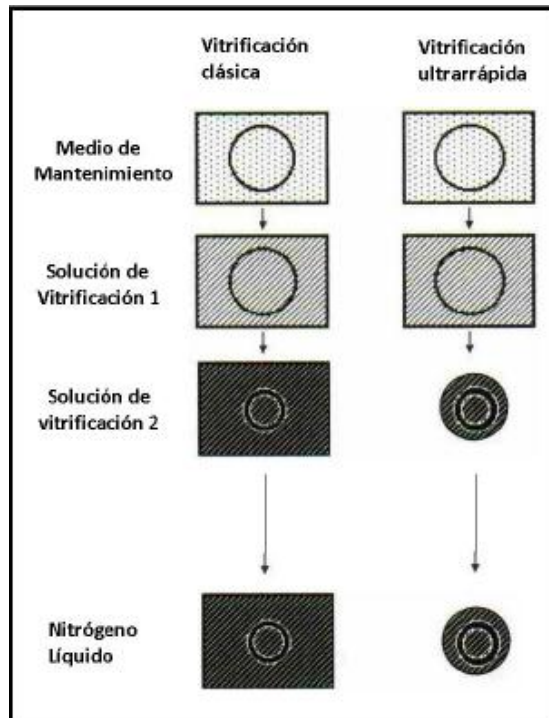


Figura 1: Representación de un embrión (círculo) durante vitrificación clásica y vitrificación ultrarrápida, la concentración de CP en solución se muestra por la oscuridad del sombreado.⁶⁶

2.7. Vitrificación como técnica de criopreservación

La vitrificación es una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene los agentes crioprotectores con la células y el nitrógeno líquido.⁴

El proceso de vitrificación fue investigado por primera vez por Tammann en 1898, pero Luyt, 60 años más tarde, reconoció el potencial de alcanzar un estado libre de hielo durante la criopreservación. En 1985, Rall y Fahy introdujeron la técnica de vitrificación en la conservación de embriones, la cual presenta algunas ventajas importantes respecto a la congelación convencional. Dentro de las ventajas que posee la vitrificación se encuentran:

No hay formación de cristales de hielo.

Mayor rapidez en el procesamiento de cada muestra.

Menor costo, por prescindir de máquinas congeladoras programables. Debido a esto, la vitrificación constituye una herramienta interesante capaz de reemplazar a la congelación convencional, especialmente cuando se intenta conservar embriones sensibles a la criopreservación, como son los producidos *in vitro*.⁴⁹

Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en nitrógeno líquido requiere entre 3 minutos 40 segundos.¹¹, 5 minutos.⁵⁰ Embrión se somete a la deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante la desvitrificación para obtener buenos resultados se deben tomar en cuenta los siguientes factores:

Volumen de la muestra

Que es la cantidad de solución vitrificante (2 µl) que se toma junto con el embrión para realizar la conservación en el nitrógeno líquido. En los sistemas de vitrificación, el volumen de la muestra es uno de los principales factores que determina la velocidad de enfriamiento, permitiendo alcanzar el estado vítreo y disminuyendo la posibilidad de formación de hielo.⁵¹

Concentración de crioprotectores

Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso. Además, no deben ser tóxicos a los embriones, entre menos contengan sales que deshidratan más rápido las células son mejores. Para reducir el daño osmótico y tóxico del crioprotector, se hace mayor uso de Etilenglicol (EG), solo o en combinación con sucrosa o trealosa ya que han demostrado ser menos tóxicos. Dado su bajo peso molecular, el EG tendría una mayor velocidad de penetración y, por ende, necesitaría menor tiempo de exposición, disminuyendo su efecto tóxico.⁴⁷

Temperatura

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc.; es decir, reducir drásticamente la actividad fisiológica de la célula. Así es posible almacenar embriones durante un largo periodo sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos.⁵²

El máximo daño en el embrión durante el enfriamiento ocurre de -15 a -16 °C Debido a la fase de transición de la membrana lipídica.³⁶

Durante el proceso de vitrificación, el rápido enfriamiento disminuye bruscamente el movimiento molecular, de modo que las moléculas de agua no tienen el tiempo suficiente para ordenarse y orientarse, de acuerdo a sus cargas, para formar los cristales de hielo. Por esta razón las soluciones vitrificadas mantienen la distribución iónica y molecular de un líquido pero en un estado sobre-enfriado

y extremadamente viscoso, con un aspecto brillante y transparente que lo diferencia del cristalino el cual es opaco y sin brillo.³⁶

Solidificación

Es un proceso físico que consiste en el cambio de estado de la materia de líquido a sólido producido por una disminución en la temperatura. En el caso de la vitrificación lo que se quiere es reducir casi a una totalidad la formación de cristales de hielo.⁵³

Esta fase se ve afectada por la fusión de los liposomas afectando el termocomportamiento de las membranas en la transición de líquido a gel y la velocidad de penetración de los crioprotectores. El daño celular incluye pérdida de microvellosidades, lesión de la membrana plasmática, cambios mitocondriales, hinchamiento del retículo endoplásmico, pérdida de uniones entre células así como fractura de zona pelúcida.³⁶

2.7.1. Principales ventajas de la vitrificación

- Contacto directo entre los embriones y el nitrógeno líquido
- No hay cristalización del embrión
- Utiliza altas concentraciones de crioprotector que disminuye el periodo de exposición del embrión a los crioprotectores
- Los procesos de vitrificación - desvitrificación son rápidos
- El uso de pequeños volúmenes provee un incremento significativo en la tasa de enfriamiento
- Las tasas de enfriamiento, pueden alcanzar velocidades entre 15,000 y 30,000°C/ minuto
- Se minimizan las crioinjurias por los cambios osmóticos
- Se reduce el tiempo del procedimiento de criopreservación (entre 2 - 10 min)
- Los protocolos son sencillos
- Se eliminan los costos de adquisición de equipos.

2.7.2. Variables que pueden afectar la eficiencia de la vitrificación

- Toxicidad de los crioprotectores.
- Temperatura de las soluciones de vitrificación.
- Tiempo de exposición del embrión al crioprotector.
- Volumen de la solución crioprotectora.
- Método de vitrificación (tasa de enfriamiento).
- Calidad y estadio de desarrollo de los embriones.

- Experiencia y eficiencia del personal.
- El contacto directo entre el nitrógeno líquido y la solución de vitrificación.

2.7.3. Desvitrificación

Los protocolos de desvitrificación deben tratar de disminuir la probabilidad de recristalización mediante una adecuada transferencia térmica. El procedimiento de desvitrificación más común para embriones es lo más rápido y directo. Durante la descongelación el rápido influjo de agua al interior de la célula, pueden causar un choque osmótico, cuya sensibilidad por la célula es dependiente de la permeabilidad de la célula al agua y los solutos, y que puede ser reducido por el uso de un buffer osmótico, no tóxico e impermeable como la sucrosa. La tasa de calentamiento óptima depende de los crioprotectores y su concentración, al igual que la tasa de congelación utilizada. Para descongelar una muestra vitrificada, se sumerge el soporte de vitrificación en un medio a temperatura fisiológica (37,5 – 39 °C), obteniendo velocidades de calentamiento entre 3,000 a 8,000 °C/minuto, dependiendo del soporte utilizado. Los embriones son puestos en una solución para calentamiento entre 20°C a 37°C, para posteriormente rehidratarlos y remover los crioprotectores utilizados.

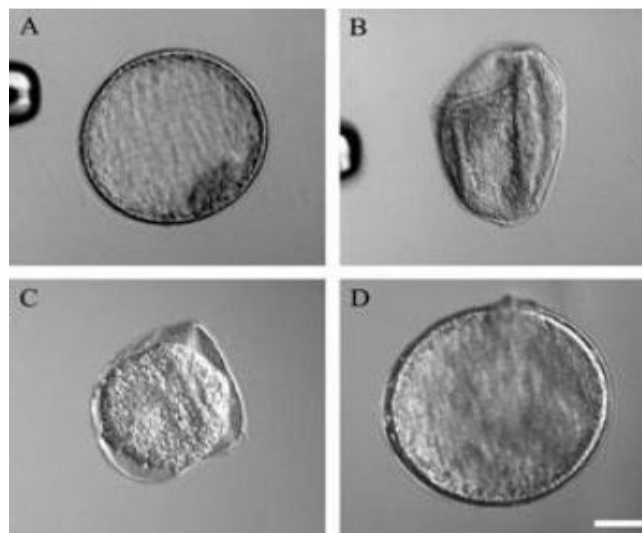


Figura 2: Respuesta de un embrión a la exposición a las soluciones de vitrificación. A: embrión en solución hiperosmótica, pierde agua intracelular por acción CPs no permeables. C: entrada en el embrión de CPs permeables. D: embrión con CPs reemplazando el agua intracelular.¹⁶

2.8. Tipos de crioprotectores

El crioprotector es una sustancia que se utiliza para proteger los tejidos biológicos cuando son sometidos a procesos como la vitrificación o la congelación, debido a la formación de hielo que estos generan. Los crioprotectores ayudan a prevenir la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intracelular y extracelular durante el proceso, para reducir el daño osmótico y tóxico del crioprotector.⁵⁴

Entre los crioprotectores existen 2 tipos los Permeables o intracelulares e impermeables o extracelulares.

2.8.1. Permeables o intracelulares

De bajo peso molecular. Deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma.⁴⁷ Dentro de los crioprotectores permeables que se encuentran disponibles están:

- Glicerol (G)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- 1-2 propanodiol
- Etilenglicol (EG)
- Propilenglicol (PG)
- Polietilenglicol (PEG)
- Etanol

2.8.2. Impermeables o extracelulares

Son de alto peso molecular deshidratan las células de los embriones durante el equilibrio sacando el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula. Son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua.⁴⁷ Dentro de los crioprotectores impermeables que se encuentran disponibles están:

- Polivinilpolidona (PVP)
- Glucosa
- Fructosa
- Ficol
- Dextrano
- Sorbitol
- Sucrosa
- Lactosa
- Trealosa
- Rafinosa

2.9. Métodos de almacenamiento para embriones vitrificados

2.9.1. Open pulled straw (OPS)

Este método consiste en adelgazar una pajilla plástica de 0-25 ml, calentándola sobre una platina y estirándola en su parte central hasta que su diámetro interior llegue a 0,7- 0,8 mm. Luego de enfriada la pajuela es cortada en su parte más delgada. El embrión es recogido por la parte más fina de la pajilla mediante capilaridad y luego esta es inmediatamente sumergida en nitrógeno líquido.⁵⁵

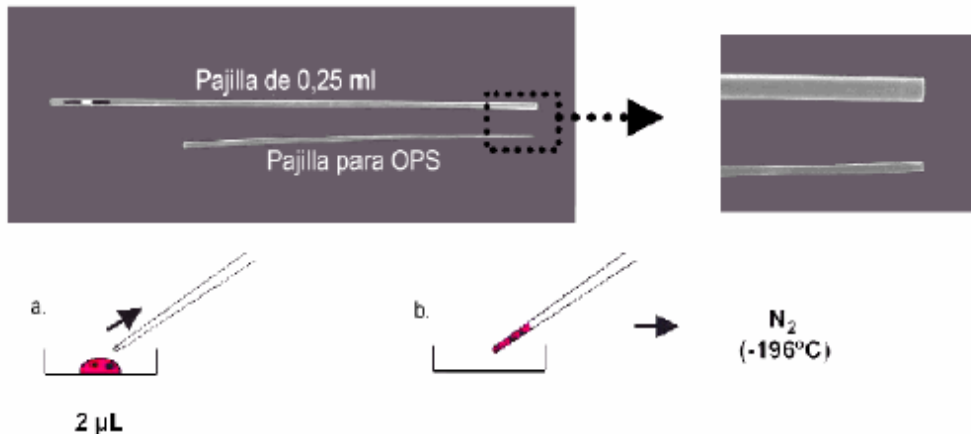


Figura 3: Pajilla abierta y estirada (Open Pulled Straw, OPS), pajilla de 0,25 ml. a. Gota de 2 µl de crioprotector con los embriones. b. Montaje de la gota por capilaridad en la pajilla y su paso directo al nitrógeno líquido.⁶⁵

2.9.2. El cryoloop

Se trata de un pequeño bucle de nylon de 20 µl de ancho y con un diámetro de 0,5- 0,7 mm montado en un tubo de acero inoxidable, que permite manejarlo a bajas temperaturas. De esta manera se formara una fina película de medio conteniendo la muestra. Una vez realizada la vitrificación, se conserva en un criotubo abierto que permite la circulación del nitrógeno líquido. La tasa de enfriamiento máxima obtenida con este dispositivo es de 32,000°C/min.⁵⁶



Figura 4: Cryoloop.⁶³

2.9.3. Cryotop

Está formado por una película de polipropileno unido a un mango de plástico y con una pajuela para cubrirlo y aislarlo una vez contenga el material vitrificado. Los embriones se cargan sobre la película y el medio se aspira casi en su totalidad quedando un volumen inferior a $0,1\mu\text{l}$, tras lo cual se sumerge en el nitrógeno líquido directamente y se cubre con la funda. La tasa de enfriamiento puede alcanzar $42,100^{\circ}\text{C} / \text{min}$.⁶³



Figura 5: Cryotop.⁶³

2.9.4. Fibreplug

Estructura de fibra con un gancho en la parte final. Permite emplear un volumen de medio mínimo de $0,5\mu\text{l}$ /embrión. Se alcanzan velocidades de enfriamiento de $40,000^{\circ}\text{C} / \text{min}$. Estos dispositivos han permitido reducir el tiempo de exposición a la solución final de vitrificación, gracias al aumento de la velocidad de enfriamiento.

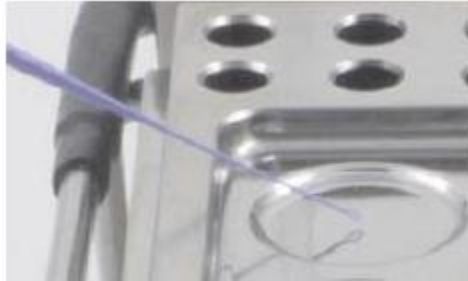


Figura 6: Fibreplug.⁶³

2.9.5. Pajuela clásica

Actualmente el elemento más utilizado para contener los embriones, tanto para la criopreservación como para su transporte y/o transferencia a una hembra receptora, lo constituye la pajuela de plástico de $0,25\text{ ml}$ de capacidad. Existen diversos modos de cargar las pajuelas, pero en la mayoría, el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de $0,5$ a 2 centímetros de solución de congelación separado de otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones con sacarosa separada por burbujas de aire. En general, las pajuelas una vez cargadas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico.

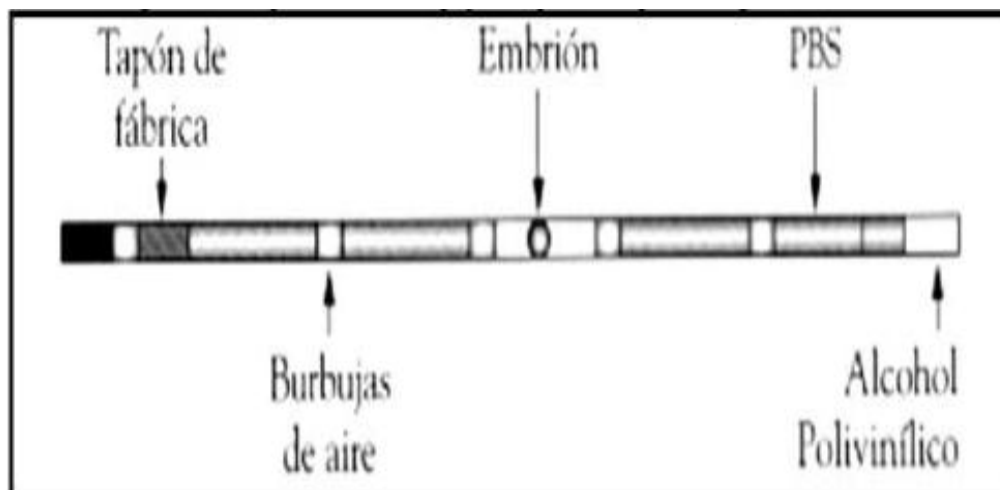


Figura 7: Pajuela clásica para cargar embriones.²⁶

2.10. Evaluación de la viabilidad post desvitrificación de embriones

Actualmente, el método más extendido y eficiente para valorar la viabilidad del embrión después de la desvitrificación es la utilización de parámetros morfológicos: forma esferoide, simetría de los blastómeros, apariencia clara y neta de los blastómeros, tonalidad oscura y uniforme, integridad de la zona pelúcida, uniformidad de la membrana celular o lesiones de membrana, ausencia de detritus celulares adheridos a la zona pelúcida, etc. Además de tomar en cuenta la re-expansión completa del blastocele y mantenimiento de la misma.

Finalmente otra manera de comprobar la viabilidad es *in vivo* realizando la transferencia directa de embriones a hembras receptoras previamente sincronizadas.

2.10.1. Efectos del descenso térmico sobre los embriones

En la actualidad ningún protocolo de congelación o vitrificación disponible garantiza la total integridad de las estructuras así preservadas. No importa “cómo” los embriones sean criopreservados, “siempre alguno muere”.

Durante la criopreservación, los embriones están expuestos a diversos tipos de injurias, las cuales son difíciles de considerar por separado ya que en muchos casos operan en conjunto. Las crioinjurias podrían deberse a.⁸

a. Formación de hielo intra o extracelular

Durante el proceso de criopreservación, la formación de hielo intracelular puede deberse a tasas de descenso térmico muy altas. Por ello el agua endocelular no tiene tiempo suficiente para alcanzar el medio extracelular, se sobre enfría, alcanza la temperatura de nucleación y finalmente se cristaliza dentro del

citoplasma. Por otra parte, si la tasa de ascenso térmico durante la descongelación y calentamiento no es rápida es posible que se produzca hielo intracelular como consecuencia de la temperatura de nucleación, o por crecimiento de pequeños cristales generados en el enfriamiento. Esto puede producirse además, por un desequilibrio entre la concentración del crioprotector y la tasa de descenso térmico.¹³

b. Aumento o disminución excesiva de volumen celular por efecto osmótico

La adición o extracción de las sustancias crioprotectoras, así como el propio proceso de congelación (efecto de solución), producen cambios de volumen en las células embrionarias que, dependiendo de su magnitud, pueden afectar su supervivencia post criopreservación.¹³

La disminución del volumen celular por una pérdida importante de agua puede determinar modificaciones en la composición del medio intracitoplásmico.

Respecto al aumento excesivo de volumen, pareciera ser crítico el manejo de los embriones inmediatamente después de la descongelación o el calentamiento.⁸

La alta concentración de crioprotectores intracelulares puede determinar que las células embrionarias incorporen agua y aumenten excesivamente de volumen, pudiendo dañar estructuras internas o bien desintegrarse por completo.

c. Efecto tóxico del crioprotector

El citoesqueleto constituye una compleja red de filamentos proteicos, extendidos a través del citoplasma, que coordinan la organización y el movimiento intracitoplásmico. Sin embargo, los elementos que lo constituyen presentan un comportamiento inestable, en donde las subunidades que lo componen se encuentran en constante recambio. Aunque los crioprotectores son necesarios para minimizar los daños que puedan ocurrir durante la criopreservación, según estos compuestos pueden también tener efectos nocivos sobre los embriones por toxicidad química.

Este autor sostiene que el daño se produciría por una alteración en la organización de los filamentos que componen el citoesqueleto, que culminaría con una despolimerización de los mismos.⁸

Otras alteraciones asociadas con la adición de sustancias crioprotectoras son el aumento del espacio perivitelino, el aumento de tamaño mitocondrial y la presencia de vacuolas dentro de las mismas, así como la aparición de signos de degeneración nuclear.¹³

d. Alteraciones de las membranas celulares

Las membranas celulares (plasmática y de organelas) son adversamente afectadas por efecto osmótico durante los procesos de criopreservación y su lesión constituye uno de los indicadores más importantes de muerte celular. Cuando el contenido de agua intracelular disminuye por debajo de 10-20%, los componentes celulares permanecen muy juntos entre sí, pudiendo determinar que las membranas pasen de un estado gel de tipo laminar, a uno hexagonal de fase II, aunque este proceso también puede producirse por efecto directo del frío.

En este estado, formado por pequeños cilindros de agua rodeados por fosfolípidos, las membranas celulares pierden la capacidad para llevar a cabo la mayoría de sus funciones. Otra causa por la cual las membranas pueden ser dañadas la constituye la formación de hielo intracelular.⁸

e. Fractura embrionaria o de la zona pelúcida

Este tipo de lesiones, probablemente se produzcan debido a diferencias en la expansión de los cristales de hielo lo cual generaría cambios irregulares de volumen en los medios de criopreservación durante un rápido cambio de fase durante la congelación convencional más del 50% de los embriones pueden ser físicamente dañados si las tasas de descenso-ascenso térmico durante la congelación-descongelación no son adecuadamente ajustadas.

La utilización de elementos flexibles (pajuelas plásticas) para contener los embriones durante la criopreservación permite amortiguar los cambios de volumen de la solución.⁸

Durante la vitrificación-calentamiento, al no producirse cambios de fase, la incidencia de este tipo de crioinjuria es menor. Esta lesión es más frecuente durante el calentamiento, y se produciría por el rápido pasaje a través de la temperatura en la cual se forma la fase vítrea (-110 a -135°C).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

La producción *in vitro* de embriones bovinos consta de cuatro etapas fundamentales maduración, fertilización, cultivo embrionario y vitrificación (ver el Anexo N° 01), se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán – Ayacucho.

3.2. Población

La población de estudio comprendió todos los ovocitos colectados por aspiración folicular a partir de ovarios de vacas sacrificadas en el Matadero de la Comunidad Campesina de Quicapata, ubicado en el distrito de Carmen Alto de la ciudad de Ayacucho.

3.3. Muestra

La muestra estuvo constituida por los ovocitos de categoría A y B (buenos y regulares) colectados por aspiración folicular a partir de los ovarios de vacas sacrificadas en el matadero de la comunidad campesina de Quicapata, ir al Anexo N° 02 para observar la clasificación de los complejos cúmulus ovocitos.

Sistema de muestreo

La selección de los ovocitos de categoría A y B (buenos y regulares) fueron valorados de acuerdo a sus características morfológicas como número, compactación de las células del cúmulus y el grado de homogeneidad del citoplasma.

En la producción *in vitro* de embriones bovinos, los ovocitos clasificados como buenos y regulares producen buen porcentaje de mórulas y blastocitos, y fueron los que se seleccionaron para este estudio.

3.4. Metodología

3.4.1. Recolección de ovarios

- Se recolectaron los ovarios de vacas post mortem procedentes del matadero de la comunidad campesina de Quicapata de la ciudad de Ayacucho.

- Los ovarios extraídos fueron removidos y separados con ayuda de una tijera y/o bisturí, del tracto reproductor, después de que los órganos internos se extraigan.
- Los ovarios bovinos obtenidos de vacas sacrificadas en el matadero, fueron transportados en solución salina (NaCl al 0,9%) suplementada con antibiótico Gentamicina a 160 mg/2ml a una temperatura de 37 °C, ir al Anexo N° 05 para ver la preparación detallada. A esta temperatura, los ovarios permanecen en el termo hasta aproximadamente 2 a 3 horas sin afectar significativamente los resultados posteriores ver Anexo N° 07.

3.4.2. Aspiración de folículos

- En el laboratorio los ovarios fueron lavados tres veces con solución salina estéril atemperada a 37 °C, con el fin de retirar el material contaminante, sangre y detritus. Antes de proceder a la aspiración se realizó una previa selección de los ovarios descartando aquellas con quistes foliculares.
- Se procedió luego a la aspiración folicular mediante la punción de folículos de 2-8 mm de diámetro, con una jeringa de 10 ml provista de una aguja N° 18. Teniendo en cuenta de no aspirar folículos menores a 2 mm ni mayores a 8 mm de diámetro. Los folículos de mayor tamaño contienen fibrina que coagula el fluido colectado y dificulta la recuperación de los ovocitos y los folículos de menor tamaño contienen ovocitos meióticamente incompetentes.
- El contenido aspirado se depositó en un tubo falcón de 15 ml de fondo cónico por las paredes para evitar dañar o remover las células del cúmulus y se dejó decantar los ovocitos por aproximadamente 15 minutos a 37°C en baño María, para luego retirar el sobrenadante. El pellet formado se retiró con ayuda de una pipeta de Pasteur ver Anexo N° 08.

3.4.3. Selección de ovocitos

- Se Colocó el pellet sobre una placa Petri de 75 mm de diámetro el cual es homogenizado con 2 ml de medio de manipulación. Es importante también lavar el tubo cónico con el medio ya antes mencionado para evitar la pérdida de ovocitos.
- Luego de ello se llevó la placa a un estereoscopio para la selección de los ovocitos ver Anexo N° 09.
- Se seleccionaron ovocitos, se realiza con una micropipeta para no dañar las células del cúmulus, los ovocitos a seleccionar corresponden a las clases A,B,C y D según el número de capas de células del cúmulus que cubren al

ovocito, para tener una eficiente maduración se utilizó solamente los de categoría A y B.

- Los ovocitos seleccionados fueron lavados tres veces mediante el pasaje a través de gotas con medio de manipulación. El propósito de este lavado será la eliminación del fluido folicular que vehiculiza los ovocitos así como también posibles contaminantes.

3.4.4. Maduración *in vitro* de ovocitos

- Se incubó en la cámara de CO₂ el medio de manipulación y las placas de 4 pocillos con medio de maduración 2 a 3 horas antes de realizar el proceso.
- Se depositó en cada pocillo un promedio de 25 ovocitos, estos se colocaron lo más juntos posibles, ya que las células del cúmulus segregan factores de maduración lo cual tiene un mejor efecto si estas están más juntas, y por lo general los ovocitos que no tienen buena calidad son ayudados por los demás.
- Se llevó la placa con los ovocitos a la incubadora de CO₂ por un periodo de 24 horas a 38,5 °C; 5% de Oxígeno; 5% de CO₂ y 95% HR para la maduración óptima.

3.4.5. Fertilización *in vitro* de ovocitos

- Se preparó el medio de fertilización con dos horas de anticipación y se incubó en la cámara de CO₂.
- Al culminar la maduración por un periodo de 24 horas se procedió a lavar dichos ovocitos en las gotas con medio de fertilización.
- Luego se procedió a observar al estereoscopio los ovocitos y proceder a seleccionar a aquellos que tengan las células de cúmulus expandidos, que es un carácter que determina una buena maduración ovocitaria.
- Con ayuda de una micropipeta se extrajo los ovocitos seleccionados y se pasó a la placa definitiva con el medio de fecundación.
- Luego se agregó 20 a 25 µl aproximadamente de semen capacitado en cada pocillo conteniendo como promedio 25 ovocitos listos a ser fertilizados. Se realizó la capacitación espermática por gradiente de Percoll ver Anexo N° 04.
- Se depositó finalmente dicha placa a la incubadora de CO₂ por 18 horas a 38,5 °C; 5% de Oxígeno; 5% de CO₂ y 95% HR.

3.4.6. Cultivo *in vitro* de embriones

- Al pasar las 18 horas de la exposición de los ovocitos con los espermatozoides, se transfirió los cigotos hacia el medio de cultivo para luego realizar la remoción de las células del cúmulus con ayuda del vórtex.

- Se realizó un último lavado con medio SOF para luego colocar en cada pocillo aproximadamente 25 cigotos conteniendo 500 µl de medio SOF (fluido oviductal sintético). En el medio de la placa de 4 well se colocó agua bidestilada para mantener la humedad del ambiente y se selló en mezcla de gases para luego incubarlos por 7 días.
- Al culminar los 7 días de cultivo se procedió a evaluar la calidad de los embriones de acuerdo a las normas de la International Embryo Transfer Society (IETS).
- La preparación de los diferentes medios para este protocolo se especifica en el Anexo N° 06.

3.4.7. Vitricación de embriones producidos *in vitro*

Protocolo N° 01 de vitricación descrito por Vajta (1998)

- Mórulas y blastocistos del día 7, de calidad excelente, buena y regular se vitrificaron empleando las soluciones descritas por.⁵⁷
- Sobre una placa calefactada a 38,5 °C se empleó medio de mantenimiento (MM) que está compuesto por TCM-199 HEPES y suplementado con 20% de SFB.
- Se procedió a preparar una placa well de 4 pocillos con las siguientes soluciones: los pocillos 1 y 2 contuvieron 800 µl de MM, el pocillo 3, 1 ml de MM suplementado con 7,5% de EG y 7,5% de DMSO, y en el pocillo 4, 1 ml de MM suplementado con 16,5% de EG y 16,5% de DMSO y 0,5 M de sucrosa.
- Los embriones se colocaron en el pocillo 1 de la placa de vitricación. A continuación, se transfirieron al pocillo 2, los embriones en grupos de 4-5, donde se incubaron durante 1 min. Después los embriones se incubaron en el pocillo 3 durante 3 minutos tras lo cual se transfirieron a una gota de 10 µl de medio del pocillo 4 donde se incubaron durante 20–25 seg. Finalmente los embriones se cargaron en pajillas de 0,25 ml y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido.

Desvitricación de embriones

- Para el proceso de desvitricación se preparó una placa well en la cual los pocillos 1 y 2 contuvieron 1,2 ml de MM suplementados con sucrosa a 0,25 M; el pocillo 3 contuvo 1 ml de MM suplementado con sucrosa a 0,15 M; y el pocillo 4 contuvo 800 µl de MM.
- Las pajillas cargados con los embriones se retiraron del nitrógeno líquido y entibiado en un termo a 37 °C por un minuto y se sumergieron inmediatamente en el pocillo 1 de la placa de la desvitricación.

- A continuación los embriones se transfirieron de forma seriada a los pocillos 2, 3 y 4 realizando tiempos de incubación de 5 min en cada uno de estos.
- Finalmente los embriones se transfirieron desde el pocillo 4 a la placa de cultivo embrionario con microgotas de 200 µl de SOF+10% SFB, se depositó finalmente dicha placa a la incubadora de CO₂ por 24 horas a 38,5 °C; 5% de Oxígeno; 5% de CO₂ y 95% HR.
- Se evaluó su viabilidad a las 6 y 18 horas. Los criterios de supervivencia serán la calidad morfológica y la capacidad de los embriones para re-expandirse.

Protocolo N° 02 de vitrificación descrito por Von Baer (2002)

- Mórulas y blastocistos del día 7, de calidad excelente, buena y regular se vitrificaron empleando las soluciones descritas por.⁵⁸
- Se utilizó dos soluciones, una solución de equilibrio (5% glicerol + 5 % etilenglicol + 0,2 M sucrosa + 10 % Suero fetal bovino + 50 ug/ ml Gentamicina) a una temperatura entre 25-26 °C, donde se colocó el embrión por 5 minutos.
- Una solución de vitrificación (20 % Glicerol +20 % etilenglicol + 0,5 M Sucrosa +10% Suero fetal bovino + 50 ug/ ml Gentamicina), donde se mantiene al embrión por 1 min.
- El embrión se colocó en pajuelas de 0,25 ml (1 embrión por pajuela) y se sumergió de inmediato en el nitrógeno líquido.

Desvitrificación de embriones

- Este proceso consistió en extraer las pajillas del tanque de nitrógeno y mantenerlas a medio ambiente por 10 segundos, luego fueron entibiadas en un termo a (37°C) por un minuto.
- El contenido fue vertido en una placa Petri pequeña conteniendo 100 µl de solución de sucrosa 0,5 M. Inmediatamente los embriones fueron colocados en otra placa con solución de sucrosa con la misma molaridad, durante 5 min.
- Luego los embriones se colocaron en un tercera placa Petri con solución sucrosa 0,2 M durante 5 minutos; transcurridos este tiempo los embriones recibieron 3 lavados en solución de SOF + 20 % SFB.
- Para la evaluación *in vitro* se cultivó por 24 h a 38,5 °C; 5% de CO₂; 5% de O₂ y 95% de HR en 200 µl de SOF + 20% de Suero Fetal.
- Se evaluó su viabilidad a las 6 y 18 horas. Los criterios de supervivencia serán la calidad morfológica y la capacidad de los embriones para re-expandirse.

3.5. Análisis de datos

El tipo de investigación realizado fue básica experimental, siguiendo un diseño de bloques completos al azar. Los protocolos de trabajo tuvieron quince repeticiones cada uno para un total de 101 embriones por protocolo, sumando 202 embriones totales puestos a vitrificar. Se comparó el porcentaje de embriones recuperados post desvitrificación, porcentaje de embriones viables y degenerados a las 6 y 18 horas (Vajta y Von Baer) para ambos protocolos, mediante la prueba estadística de T Student para determinar si existe diferencias estadísticas entre los dos protocolos desarrollados. El análisis fue realizado usando el paquete estadístico MINITAB 17. Las comparaciones de las medias con un $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

En cada una de las etapas post desvitrificación se determinó:

El porcentaje de embriones recuperados

Se halla del número total de embriones recuperados entre el total de embriones puestos a vitrificar.

$$\%ER = \frac{N^{\circ} \text{ embriones recuperados}}{N^{\circ} \text{ embriones vitrificados}} \times 100$$

El porcentaje de embriones viables a las 6 y 18 horas

Se determina del número total de embriones viables a las 6 y 18 horas entre el número total de embriones recuperados post desvitrificación.

$$\%EV = \frac{N^{\circ} \text{ embriones viables 6 y 18 horas}}{N^{\circ} \text{ embriones recuperados}} \times 100$$

El porcentaje de embriones degenerados a las 6 y 18 horas

Se determina del número total de embriones degenerados a las 6 y 18 horas entre el número total de embriones recuperados post desvitrificación.

$$\%ED = \frac{N^{\circ} \text{ embriones muertos 6 y 18 horas}}{N^{\circ} \text{ embriones recuperados}} \times 100$$

IV. RESULTADOS

Se realizaron quince procesos de producción de embriones bovinos *in vitro* en donde se colectaron 506 ovarios del matadero de la comunidad campesina de Quicapata, recuperando un total de 1396 ovocitos haciendo un promedio de 2,8 ovocitos por ovario aspirado entre calidad bueno, regular, malo y degenerado, fueron madurados sólo ovocitos de calidad bueno y regular por un tiempo de 24 horas y fertilizados con espermatozoides capacitados por un tiempo de 18 horas y cultivados por un tiempo de 7 días.

Un total de 202 embriones de calidad bueno y regular producidos *in vitro* fueron seleccionados al azar para ser vitrificados con dos diferentes protocolos de vitrificación. 101 en Vajta y 101 en Von Baer. Los embriones fueron vitrificados en diferentes estados de desarrollo: mórula temprana (111), mórula compacta (62), blastocisto temprano (16) y blastocisto expandido (13).

De los embriones criopreservados 161 embriones fueron desvitrificados, los cuales fueron cultivados para evaluar la calidad morfológica y la reexpansión del blastocele. 41 embriones se perdieron durante el proceso de desvitrificación.

Tabla 1. Embriones recuperados al momento de la desvitrificación, según el protocolo, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

PROTOCOLO	N	PROMEDIO \pm DS	MAX	MIN	CV (%)
Vajta	15	85,1 \pm 15,9 ^a	100	50	18,7
Von Baer	15	76,2 \pm 14,8 ^a	100	50	19,5

Los valores están expresados como el porcentaje promedio de embriones recuperados, con la desviación estándar. Los valores con superíndices iguales no difieren significativamente ($P > 0,05$), Prueba T-Student

Leyenda: N = Número de repeticiones
 DS = Desviación estándar
 MAX = Valor máximo
 MIN = Valor mínimo
 CV = Coeficiente de variación

Tabla 2. Embriones viables desvitrificados a las 6 horas del cultivo, según el protocolo, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

PROTOCOLO	N	PROMEDIO \pm DS	MAX	MIN	CV (%)
Vajta	15	27,8 \pm 19,6 ^a	67	0	70,5
Von Baer	15	49,6 \pm 13,6 ^b	75	20	27,4

Los valores están expresados como el porcentaje promedio de embriones viables 6 horas, con la desviación estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente ($P < 0,05$). Prueba T-Student

Leyenda: N = Número de repeticiones
 DS = Desviación estándar
 MAX = Valor máximo
 MIN = Valor mínimo
 CV = Coeficiente de variación

Tabla 3. Embriones viables desvitrificados a las 18 horas del cultivo, según el protocolo, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

PROTOCOLO	N	PROMEDIO \pm DS	MAX	MIN	CV (%)
Vajta	15	21,6 \pm 18,2 ^a	67	0	84,4
Von Baer	15	41,3 \pm 14,8 ^b	75	20	35,8

Los valores están expresados como el porcentaje promedio de embriones viables totales, con la desviación estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente ($P < 0,05$). Prueba T-Student

Leyenda: N = Número de repeticiones
 DS = Desviación estándar
 MAX = Valor máximo
 MIN = Valor mínimo
 CV = Coeficiente de variación

Tabla 4. Embriones degenerados desvitrificados a las 18 horas del cultivo, según el protocolo, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

PROTOCOLO	N	PROMEDIO \pm DS	MAX	MIN	CV (%)
Vajta	15	78,4 \pm 18,2 ^a	100	33	23,2
Von Baer	15	58,7 \pm 14,8 ^b	80	25	25,2

Los valores están expresados como el porcentaje promedio de embriones degenerados totales, con la desviación estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente ($P < 0,05$). Prueba T-Student

Leyenda: N = Número de repeticiones
 DS = Desviación estándar
 MAX = Valor máximo
 MIN = Valor mínimo
 CV = Coeficiente de variación

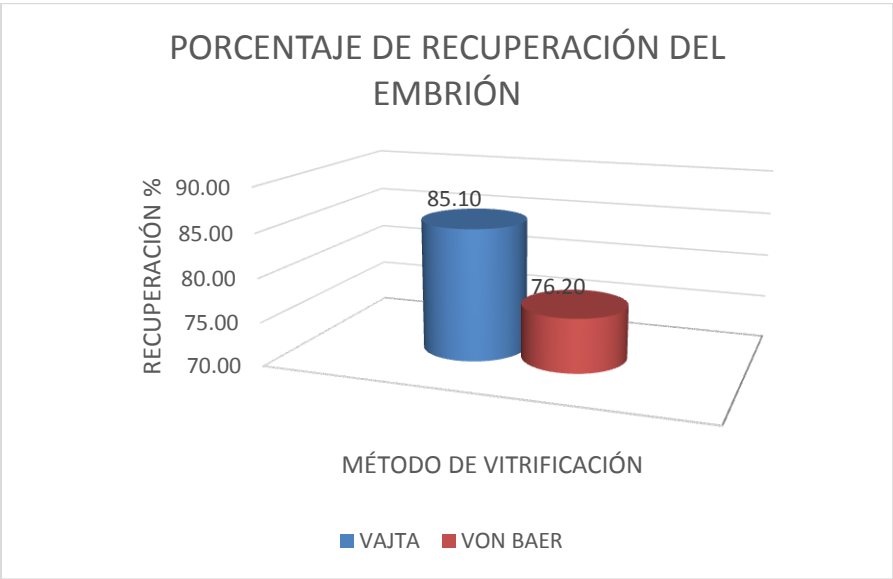


Figura 8. Embriones recuperados al momento de la desvitrificación, según el protocolo, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

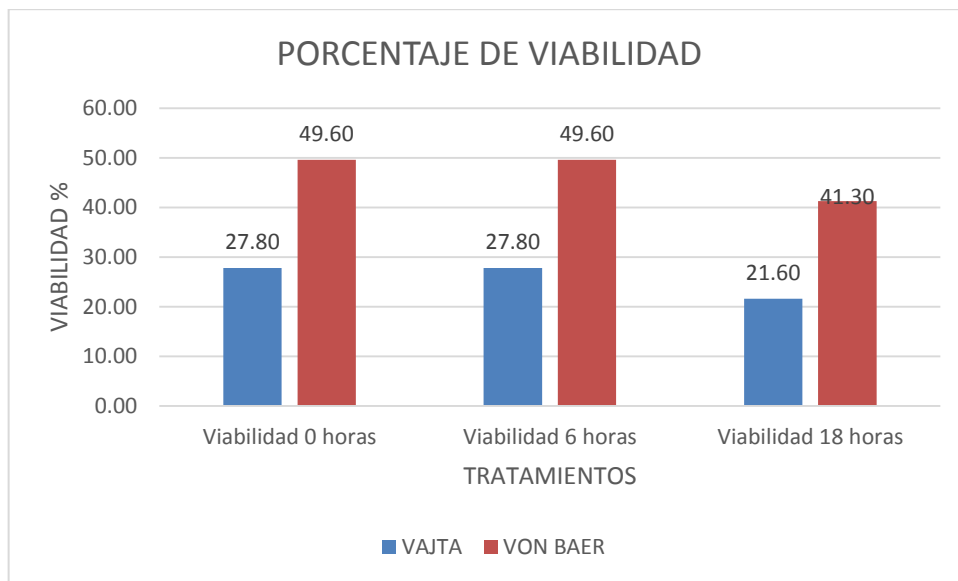


Figura 9. Embriones viables desvitrificados a las 0, 6 y 18 horas del cultivo, según el protocolo, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

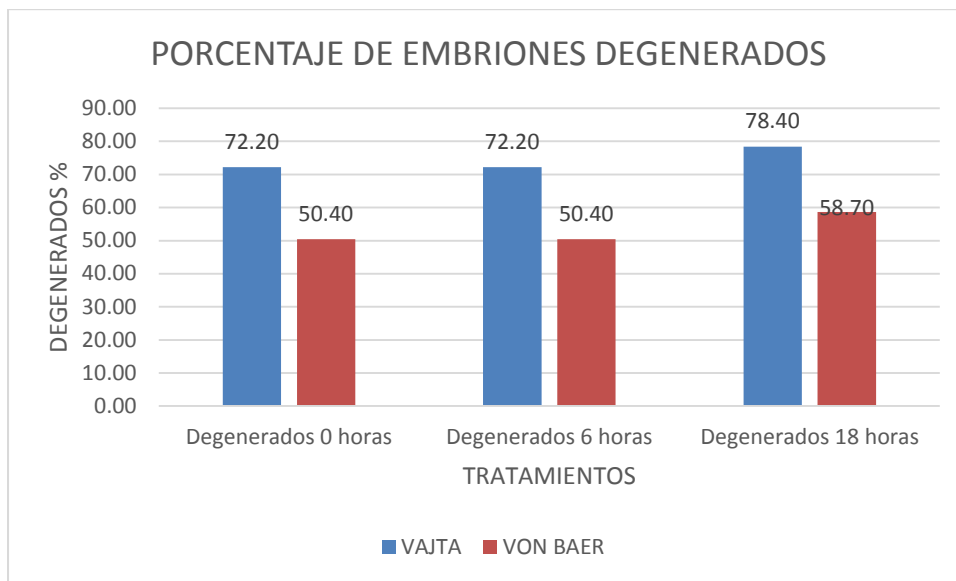


Figura 10. Embriones degenerados desvitrificados a las 0, 6 y 18 horas del cultivo, según el protocolo, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

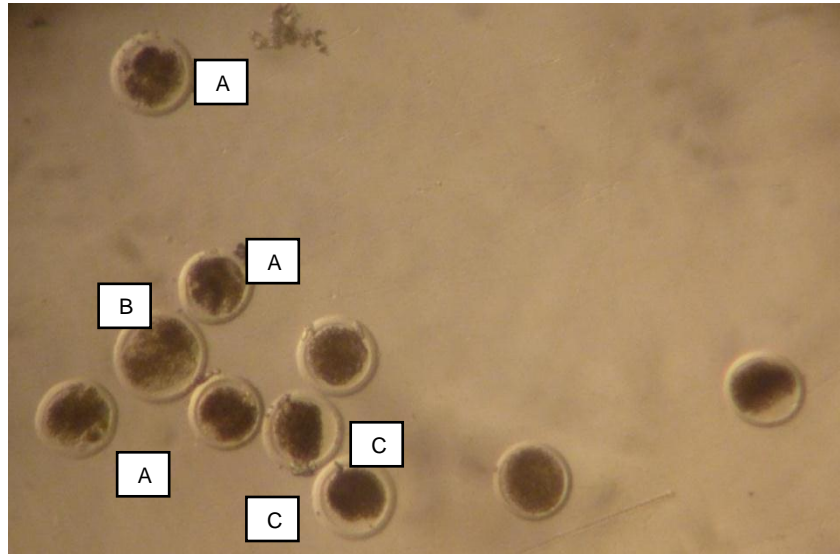


Figura 11. Embriones bovinos producidos *in vitro* mórula (A), blastocisto (B) y degenerados (C), desvitrificados y evaluados a las 6 y 18 horas del cultivo, según el protocolo Von Baer, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

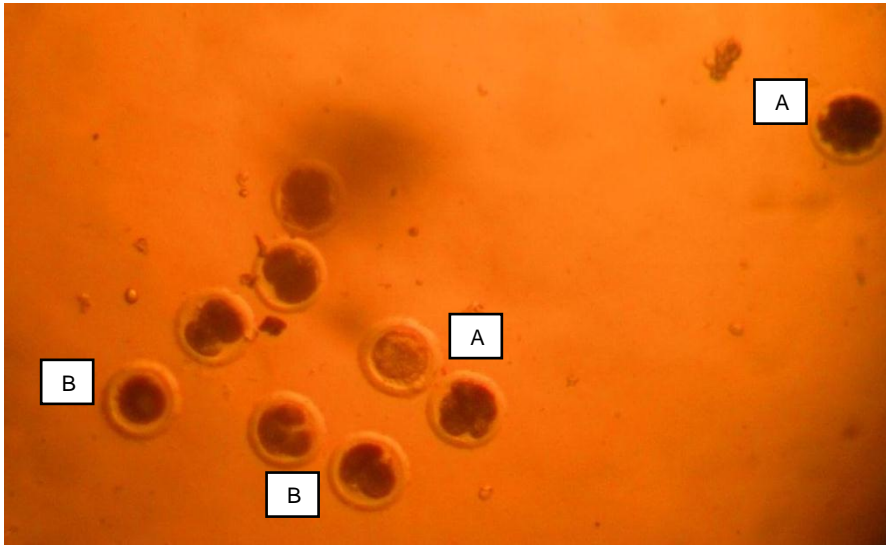


Figura 12. Embriones bovinos producidos *in vitro* mórula (A) y degenerados (B), desvitrificados y evaluados a las 6 y 18 horas del cultivo, según el protocolo Vajta, EEA - INIA, Ayacucho 2015 - 2016.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó dos protocolos de vitrificación Vajta y Von Baer para los embriones bovinos producidos *in vitro* utilizando el medio de cultivo SOF, a partir de ovocitos obtenidos por aspiración folicular de ovarios colectados del matadero.

En la tabla 1 se muestra los resultados obtenidos de los embriones recuperados al momento de la desvitrificación, señalando que para el primer protocolo se obtuvo un 85,10 % de embriones recuperados y para el segundo protocolo un 76,20 %, no existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P>0,05$), para ambos protocolos con respecto al porcentaje promedio de embriones recuperados, utilizando una concentración de 1,2 ml de MM + sucrosa 0,25M, 1 ml de MM + sucrosa 0,15M y 800 μ l de MM para el primer protocolo y 100 μ l de sucrosa 0,5M y sucrosa 0,2M para el segundo protocolo. Además es importante señalar que en esta etapa, el proceso de desvitrificación es tan importante como el de vitrificación. Si no se realiza correctamente se produce el fenómeno de la formación de cristales de hielo. El calentamiento debe desarrollarse rápidamente, para lo cual, las pajillas se sumergen de forma casi inmediata en soluciones de calentamiento para que el intercambio de temperatura suceda lo más rápido posible.⁵²

Dadas las altas concentraciones de crioprotectores empleados en la vitrificación para ambos protocolos, fue necesario realizar un proceso de eliminación y de rehidratación celular. Para conseguirlo, se realizó un proceso de desvitrificación en varias etapas, mediante el cual se sometió las pajillas conteniendo embriones a soluciones con concentraciones decrecientes de crioprotectores no permeables que, por efecto osmótico favorecen la salida de crioprotectores intracelulares, evitando los bruscos intercambios de agua de esta manera para ambos protocolos se empleó la sucrosa como crioprotector no permeable en

diferentes soluciones con concentraciones de 0,25 y 0,15 M para Vajta y 0,5 y 0,2 M para Von Baer permitiendo una recuperación buena de embriones. En un estudio realizado¹¹, el 89% de los blastocistos vitrificados fueron recuperados post desvitrificación por método Vajta siendo superior a nuestra investigación que fue de 85,10 %. Para el proceso de desvitrificación, los embriones vitrificados son sumergidos en una serie de soluciones hipertónicas y rehidratantes, que contienen concentraciones decrecientes de soluciones osmóticas no permeables para mantener el equilibrio entre la presión osmótica interna y externa.¹², El tiempo de exposición del embrión con las soluciones hiperosmóticas decrecientes varía entre 3 y 5 min por paso.¹², durante el calentamiento, la sucrosa actúa como una solución buffer para evitar la excesiva hinchazón de los embriones durante la remoción del crioprotector de las células.¹⁵

En la tabla 2 y 3 se muestra el porcentaje de embriones viables desvitrificados a las 6 y 18 horas del cultivo (figura 11 y 12), durante estas etapas se evaluaron la viabilidad de los embriones bovinos puestos a cultivar en 200 µl de SOF+10% SFB para el primer protocolo y 200 µl de SOF + 20% de Suero Fetal para el segundo protocolo. Señalando que el porcentaje de embriones viables a las 6 horas para el protocolo Vajta fue de 27,80 % y para el segundo protocolo que es Von Baer fue de 49,60 %, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$), para ambos protocolos con respecto al porcentaje de embriones viables a las 6 horas.

De igual manera señalar que el porcentaje de embriones viables a las 18 horas para el protocolo Vajta fue de 21,60% y para el segundo protocolo Von Baer fue de 41,30%, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$), para ambos protocolos con respecto al porcentaje de embriones viables a las 18 horas.

Los resultados obtenidos de la viabilidad de embriones bovinos post desvitrificación con concentraciones de MM + 7,5% EG + 7,5% DMSO y MM + 16,5% EG + 16,5% DMSO + sucrosa 0,5M para el primer protocolo y 5% glicerol + 5 % etilenglicol + 0,2 M sucrosa + 10 % Suero fetal bovino + 50 ug/ ml Gentamicina y 20 % Glicerol + 20 % etilenglicol + 0,5 M Sucrosa + 10% Suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina para el segundo protocolo, resultando ambos inferiores a lo reportado por², quien vitrificó embriones bovinos producidos *in vitro* obteniendo tasas de re-expansión de blastocistos y embriones

con zona pelucida de 67 y 87%, a los 72 horas respectivamente, utilizando el medio de equilibrio de 12,5% EG + 12,5% DMSO a 20 a 22 °C y solución de vitrificación de 25% EG + 25% DMSO a 4 °C.

Similar estudio fue reportado por¹³, que evaluaron tasas de expansión a las 12 horas post cultivo utilizando embriones producidos *in vitro* criopreservados mediante congelación lenta (1,4 M Glicerol) y vitrificación (25 % glicerol + 25 % etilenglicol en tres pasos), sus resultados fueron de 46,7 % de embriones expandidos al utilizar congelación lenta y 38,1 % al utilizar vitrificación, se puede observar que los embriones viables en nuestra investigación para el segundo protocolo fue superior con 49,60 % a las 6 horas de cultivo.

Por otra parte⁶⁷, reporta la viabilidad post vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* con los grupos de estudio (T1: DMSO 15% + DMF 15%, T2: DMSO 20% + DMF 20% y control: EG 20% + DMSO 20%), con porcentajes de re-expansión a las 6 horas (61,9%, 91,6% y 63,8%) y a las 18 horas (83,3%, 91,6% y 63,8%).

En su trabajo de investigación realizada por¹⁰, vitrificó un total de 28 embriones en diferentes estados de desarrollo: mórula (8), blastocisto temprano (11) y blastocisto normal (9), después de la evaluación realizada a las 24 y 48 horas no se observó re-expansión ni eclosión embrionaria en los embriones desvitrificados. Estos resultados diversos se pueden sustentar de acuerdo a estudios realizados por¹², quienes explican que el proceso que posibilita la efectividad de la criopreservación, está relacionado con la superficie de contacto y el tiempo de exposición del embrión con el criopreservante.

En la tabla 4 se muestra el porcentaje de embriones degenerados desvitrificados a las 18 horas del cultivo, señalando que para el primer protocolo se obtuvo un 78,40% de embriones degenerados y para el segundo protocolo un 58,70%, existiendo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$), para ambos protocolos con respecto al porcentaje de embriones degenerados a las 18 horas.

En un estudio reportado por¹⁷, en la evaluación del parámetro de degeneración embrionaria tanto a las 12 como a las 24 horas de cultivo, sin importar la procedencia de los embriones, los tratamientos que se sometieron al proceso de vitrificación (T4, T5, T6), fueron los que presentaron un mayor número de embriones degenerados y este efecto es aún más notorio en los embriones producidos *in vitro* y sometidos a vitrificación (T5, T6), con más de un 50% de los embriones degenerados a las 24 horas de cultivo.

Por otra parte¹³, reporta con embriones obtenidos *in vitro*, los porcentajes de embriones degenerados fueron de 36,6% para congelación lenta y 40,2 % para vitrificación a las 12 horas de cultivo. A nuestro criterio y de acuerdo con⁵⁶, estos bajos resultados pueden deberse a que los embriones producidos *in vitro* presentan menos cantidad de blastómeros que los producidos *in vivo*, por otra parte.⁴⁷ Sustenta que los embriones *in vitro* se caracterizan por alteraciones en la organización del citoesqueleto, mayor sensibilidad a la manipulación y a la criopreservación y un detrimento en su competencia para el desarrollo posterior, siendo esta la posible causa de la alta tasa de degeneración post desvitrificación de los mismos.

En contraste de lo que ocurre con los embriones bovinos producidos *in vivo*, los embriones producidos *in vitro* presentan un mayor daño y una capacidad disminuida de sobrevivencia después de la criopreservación.⁶²

Los embriones cuando son vitrificados pueden sufrir daños morfológicos y funcionales, denominados crioinjurias, dentro de las crioinjurias, se encuentran alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, por la formación de cristales de hielo, fragmentación del ADN, daño en el huso meiótico, apoptosis celular y expresión génica alterada.¹¹

Se ha establecido que el número de células y la compactación en embriones producidos *in vitro* puede ser menor comparada con los embriones producidos *in vivo*. El efecto del estado embrionario para sobrevivir a los procedimientos de criopreservación está relacionado con el número de células.²¹

Después de la vitrificación, se disminuye el número de células en la masa celular interna y este factor puede explicar por qué la viabilidad de los embriones *in vitro* después de la criopreservación es algunas veces escasa.⁴⁸

Las diferencias en la tolerancia a la criopreservación, se pueden explicar por las diferencias entre mórulas y blastocistos, como el tamaño celular y, posiblemente, permeabilidad alterada a los crioprotectores y la concentración de lípidos, periodos largos de exposición al crioprotector son nocivos para mórulas que son más sensibles a la exposición del crioprotector, necesitando, posiblemente, tiempos de exposición más cortos, en el caso de mórulas, la concentración de lípidos es mayor que el encontrado en blastocistos, lo cual, favorece que estas sean más susceptibles a presentar crioinjurias.¹⁶

A pesar de algunas ventajas que ofrece la vitrificación existen algunas variables que pueden afectar los resultados, algunas de estas son compartidas con la

técnica de congelación, como la toxicidad de los crioprotectores, los cuales pueden inducir daños embrionarios dependiendo de su concentración, las otras variables están ligadas, principalmente, a la técnica como tal, es decir, al manejo del protocolo en cada laboratorio. Como ya se mencionó son diversas las modificaciones reportadas en cada publicación (procedimiento de vitrificación), las cuales, hacen que los resultados también varíen de laboratorio a laboratorio. Estas diferencias en los resultados pueden estar relacionadas con los factores mencionados anteriormente, como el tipo y la concentración de crioprotector(es) utilizado(s), la combinación de los mismos, el sistema de empaque y de métodos aplicados para la vitrificación, la tasa de enfriamiento, el volumen utilizado para la vitrificación, la calidad y el estado de embrión, así como la habilidad del técnico.

Básicamente, la eficiencia de la técnica empleada puede ser probada, como ya fue mencionado, *in vitro*, mediante la valoración de la viabilidad del embrión morfológicamente después de la desvitrificación (re-expansión y eclosión) o, *in vivo*, transfiriendo los embriones desvitrificados a receptoras y, posteriormente, evaluando las tasas de gestación y de nacimientos.¹²

Con base en los resultados obtenidos, la vitrificación por el método Von Baer con 5% glicerol + 5 % etilenglicol + 0,2 M sucrosa + 10 % Suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina y 20 % Glicerol + 20 % etilenglicol + 0,5 M Sucrosa + 10% Suero fetal bovino + 50 ug/ml Gentamicina, es un protocolo alternativo para tomar en cuenta para la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*, con un 41,30% de viabilidad embrionaria a las 18 horas en la investigación realizada, esta respuesta podría ser debido a que existe una buena combinación de crioprotectores, más estables y con mayor capacidad protectora tal cual menciona⁵⁰, investigador que realizó un estudio de vitrificación de embriones de llama recuperados mediante una técnica no quirúrgica a los 6,5 días post servicio en llamas superestimuladas, tomando como protocolo reportado por⁵⁸, obteniendo altas tasas de viabilidad 75%, durante 1 hora de cultivo. Sin embargo se requieren estudios en los que se evalúe el mantenimiento de los embriones viables por más tiempo y la implementación de otras pruebas que validen la viabilidad embrionaria.

VI. CONCLUSIONES

1. Ambos protocolos de vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* permiten obtener similares porcentajes de recuperación de embriones post desvitrificación, no existiendo diferencia significativa ($P>0,05$) entre ambos protocolos para esta primera etapa.
2. La vitrificación de embriones para el segundo protocolo Von Baer permite un mayor porcentaje de viabilidad de 49,60 % a las seis horas de cultivo en contraste con el primer protocolo Vajta de 27,80 %, asimismo con un 41,30% de embriones viables a las 18 horas para el segundo protocolo en comparación con el primero que fue de 21,60%, existiendo diferencia significativa ($P<0,05$) entre ambos protocolos de vitrificación.
3. El protocolo Von Baer puede ser considerado una alternativa viable para la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*, dado que existe una buena combinación de crioprotectores, más estables y con mayor capacidad protectora sobre la integridad de la membrana celular y la morfología normal de los embriones bovinos.

VII. RECOMENDACIONES

1. De acuerdo a los resultados obtenidos con las metodologías descritas en esta investigación, se recomienda que se deben optimizar los protocolos tanto en el uso de crioprotectores y el tiempo de estabilización de los embriones en las soluciones vitrificantes y desvitrificantes. Ya que estos factores influyen en la viabilidad embrionaria después de criopreservar.
2. Una de las condiciones obligadas para producir embriones *in vitro* y vitrificarlos, es mantener todo el material que se va a utilizar esterilizado, no reutilizar el material y mantener en óptimas condiciones de asepsia el laboratorio.
3. Asimismo en el caso de embriones producidos *in vitro* es recomendable ensayar nuevos protocolos de criopreservación que aporten resultados superiores para favorecer la comercialización a gran escala de este tipo de embriones.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albarracín Monje J. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: estudio estructural de cromosomas, microtúbulos, y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona; 2005.
2. Rodríguez P. Vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC; 2009.
3. Thibier M. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. Embryo Transfer Newsletter. 2007; 25: 4-9.
4. Rall W, Fahy G. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196° vitrification. Nature. 1985; 313: 573-575.
5. Cabrera P, Fernández A, Bastidas P, Perozo E, Molina M, Betancur A, Díaz T. Vitrificación: Una alternativa para la criopreservación de embriones. En: Rev. Fac. Cienc. Vet. Maracay. 2006; 47.
6. Ramón J, Deneb P. Contribución de la biotecnología reproductiva a la biodiversidad (página principal en internet) Yucatán- México: cicy.mx (acceso 24 de octubre del 2015). Disponible en: <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap9/09%20Contribucion%20de%20la%20biotecnologia.pdf>
7. Landinez J, Hernández-Fonseca H. Historia y evolución de las biotecnologías aplicadas a la reproducción (página principal en internet). Venezuela; 2008 (acceso 29 de octubre del 2015). Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_57.pdf.
8. Mucci N, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Rev. Electrónica UACH (revista en internet) 2006 (consultado 17 de octubre del 2015); 38(02). Disponible en: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2006000200002&script=sci_arttext
9. Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consecuencia de la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* versus *in vivo* implicados en la obtención de blastocistos y la calidad de blastocistos. PubMed Mol Reprod Dev. (revista en internet) febrero del 2002 (consultado 5 de setiembre del 2015); 61(2). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803560>
10. Garzón Niño L. Vitrificación de embriones bovinos producidos in vitro (tesis de pregrado). Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales; 2011.
11. Silva M, Berland A. Vitrificación de blastocitos bovinos producidos *in vitro* con el método open Pulled straw (OPS). Archivos médicos veterinarios. 2004; 36: 79- 85.
12. Martínez A, Valcárcel A, De Las Heras M, De Matos D, Furnus C, Brogliatti G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. Anim. Reprod. Sci. 2002; 73: 11-21.
13. Serrano C, Sierra R, Sánchez J, Restrepo L, Olivera M. Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos *in vitro*. Rev. Col. Cie. Pec. 2002; 15(3): 286-292.
14. Villamediana Monreal P. Sobrevivencia de embriones bovinos mestizos (*Bos taurus* x *Bos indicus*) producidos *in vitro* tras su vitrificación en pajuelas estiradas cerradas (Trabajo de Ascenso). Maracaibo-Venezuela:

- Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Biología; 2011.
15. Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Factors affecting survival rates of in vitro produced embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim Reprod Sci.* 1996; 45: 191-200.
 16. Martínez A, Valcárcel A. Vitrificación de embriones bovinos obtenidos *in vitro*. 2008; *Reproducción.* 23:21-33.
 17. Guerra R, Solis A, Sandoya G, de Armas R. Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos *in vitro* e *in vivo*. En: IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba IRAC, 2011. p. 309
 18. Gil A, Canseco R, Montiel F, Zárate O. Efecto del método de criopreservación sobre el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos producidos *in vivo*. En: XXIV Reunión Científica- Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y III del Trópico Mexicano 2011.
 19. Pavlovic V, Aleksic J. In vitro produkcija goveih embriona. *Veterinarski Glasnik.* 2003; 57: 257-263.
 20. Báez F, Chávez A, Hernández H, Villamedina P. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Rev. Científica (revista en internet)* 2010 (consultado 20 de Julio de 2013); 20 (03). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S07982259201000300007
 21. Mejía, A. Evolución de la Biotecnología Reproductiva en Bovinos (página principal en internet): Innovación tecnológica buscando maximizar la eficiencia en los sistemas ganaderos bovinos y equinos tropicales; 2009 (actualiza el 2 de diciembre 2009, acceso 11 de setiembre del 2015). Disponible en: <http://ganaderiatecnologica.blogspot.com/2009/12/evolucion-de-la-biotecnologia.html>
 22. López A, Olivares M, Ruiz T, Tarazona A. Efecto del cocultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Rev. MVZ. Córdoba (revista en internet)* 2007 (consultado 26 de noviembre de 2013); 12(02). Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/ojs/index.php/mvz/article/view/147>
 23. Palma G. Biotecnología de la reproducción, 2da. Edición. Talleres de Pugliese y siena. Mar del Plata- Argentina. Cap. 15 y 16; 2008.
 24. Rea M, Cortez J, Olivares J, Cubillo P. Obtención de embriones por Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos. *Biofarbo.* 2001; 9: 59-66.
 25. Fernández A, Bastidas P, Trocóniz J. Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. Universidad central de Venezuela, Venezuela. 1997; Pg. 324-325.
 26. Palma G. Biotecnología de la reproducción. Argentina: Edit. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2001.
 27. Estación experimental agropecuaria INTA. Manual para la producción *in vitro* y criopreservación de embriones bovinos. Balcarse-Argentina: Grupo de biotecnología de la reproducción; 2006.
 28. Fernández A, Díaz T, Muñoz G. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev. Facultad de Ciencias Veterinarias (revista en internet);* 2007 (consultado 22 de Junio de 2015)48 (01). Disponible en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0258-65762007000100006&script=sci_arttext

29. Lattanzi M. Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinós (Tesis doctoral). Buenos Aires Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires; 2010. Disponible en:http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4682_Lattanzi.pdf
30. Bonilla-Musoles, Dolz, Moreno, Raga. Reproducción asistida: abordaje en la práctica clínica. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 2009.
31. Hafez E. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ªed. España. Edit. MC Graw Hill; 2002.
32. Cabrera P, Yoong W, Gamarra G. Evaluación de la fertilidad *in vitro* del semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados. Rev. Investigación Veterinaria Perú. 2009; 10(01): 28-32.
33. Filipiak Y, Larocca C. Fertilización *in vitro* en bovinos, manual teórico práctico, área de biotecnología de la reproducción animal: Universidad de la república de Montevideo. Uruguay; 2010.
34. Ahuja C, Montiel F, Pérez P, Gallegos J. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. Rev. Zootecnia Tropical (revista en internet) 2009 (consultado 26 de Junio de 2015); 27 (03). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-72692009000300007&script=sci_arttext
35. Herradón P, Quintela L, Becerra J, Ruibal S, Fernández M. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos: XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú. Arch. Latinoam. Prod. Anim (revista en internet) 2007 (consultado 26 de Junio de 2015); 15(01). Disponible en: http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2015%20Supl/p_herradon.pdf
36. Wolfe J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology. 1999; 39: 103-129.
37. Lenhninger A, Blochemlstry O. The formation and function of oviduct fluid. Report fert. 1988; 8: 843 - 846.
38. Garden H, Kaye P. Insulin increases cell numbers an morphological development in house preimplantation embryos *in vivo*. Reprodert. 1991; 379 -391.
39. Sirard M, Parrish L, Ware C. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally. Compent embryos. 1988; 39: 546 -552.
40. Riddel J. Efiects of antibiotics on development capacity of bovine embryos. 1985; 30:94.
41. Ruiz J, Correa J. Desarrollo partenogenético *in vitro* con ovocitos vitrificados bovinos.produccionbovina.com/información-técnica/..26-Ruiz.vitrificación. Acceso junio 12 de 2015; 2007.
42. Blanco M. Manejo de Ganado vacuno. Edit. ITDG- Perú; 2001.
43. Instituto Nacional de Innovación Agraria. Programa nacional de investigación en bovinos. 2006. Resumen ejecutivo disponible: www.inia.gob.pe/Bovinos/resumen.htm.
44. Rivas E, Veli E, Aquino Y, Rivas V, Pastor S, Estrada R. Accion para la caracterización y conservación del bovino criollo peruano (Bos taurus). AGRI Animal genetic Resources Information, N° 40 (33-42). 2007.
45. Ordenanza Regional N° 023-2008- GRA/CR. Plan regional de desarrollo ganadero Ayacucho al 2015; 2008. disponible en www.elperuano.pe.
46. Chacón L, Martínez W, Valvuená D. La biotecnología aplicada en la reproducción bovina. Graficas Atlantis. Bogotá, Colombia. 2002:12 -19.

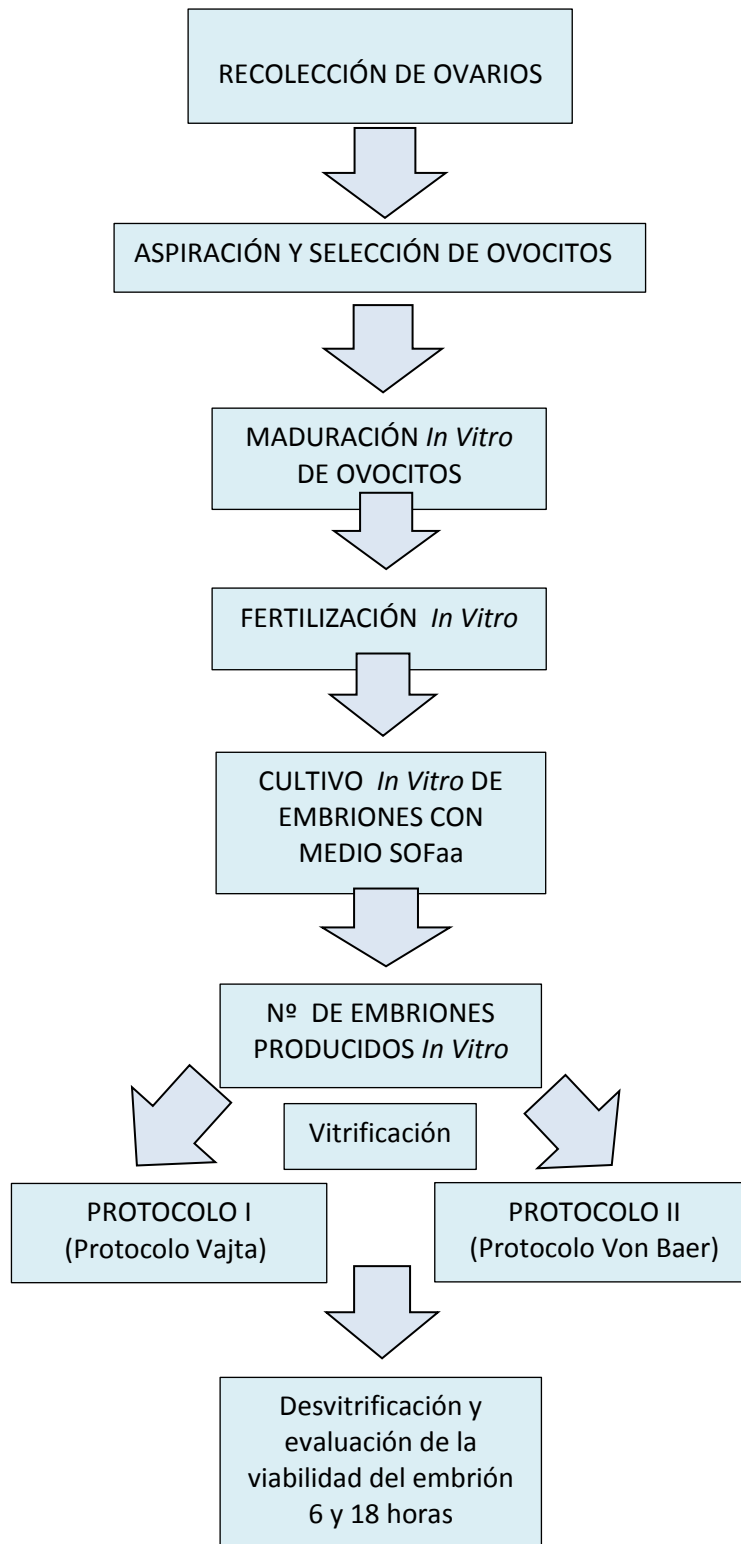
47. Celestinos M, Gatica M. Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. Archivos médicos veterinarios. Valdivia Chile. 2002; 32: 84 – 88.
48. Mucci N, Aller J, Cabodevila J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R. 1995 criopreservación de embriones bovinos. Taurus. Vol. Tandil, Argentina. 1995:20-35.
49. Montiel F, Ahuja C, gallegos J, Pérez P. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. Revista ganadera. España. 2010; 17: 34 – 37.
50. Vásquez, M; Cervantes, M; Cordero, A; Cadena, O; Huanca, T y Huanca, W. Vitrificación de embriones de llamas, estudio preliminar. Perú facultad de veterinaria. Universidad mayor de san Marcos; 2007.
51. Kaiser G, Aller J, Altrona R. Volumen de la solución de vitrificación y su relación con la viabilidad. Mar del Plata-Argentina; 1998.
52. Palasz A, de La Fuente J. Cultivo de embriones bovinos Efecto de los Medios de cultivo y de los requerimientos fisiológicos sobre la calidad de los embriones producidos *in vitro*. Departamento de producción animal y conservación de recursos zoogenéticos Madrid España; 2009.
53. Aguiar C, Freitas L, Chaves R, López F, Lima P, Goncalves P. Efecto de los retinoides en el desarrollo *in vitro* de embriones. Reproducción en animales domésticos. Editorial Blackwell Publishing sao Pablo, Brasil. 2010: 68 -72.
54. Bajo A, Coroleu L. Fundamentos de la reproducción, panamericana, España. 2009: 270-272.
55. Urbina L. Fertilidad y reproducción asistida, panamericana Caracas Venezuela. 2008: 542-543.
56. Lazcano J, Maldonado I, López P, Moreno D, Bermúdez A. Estudio clínico comparativo resultado de la vitrificación y desvitrificación de embriones con dos tipos de sistemas abiertos cryotop versus cryolock. 2010; 2:79-83.
57. Vajta G, Rindom N, Peura T, Helm T, Greve, Callesen H. The effect of Media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (ops) vitrification. Embryo technology center, Danish Institute of Agricultural Sciences. Australia; 1998.
58. Von Baer A, Del Campo M, Donoso X, Toro F, Von Baer L, Montecinos S, Rodríguez-Martínez, H, Palasz A. Vitrification and cold storage of llama (*Lama glama*) hatched blastocysts. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Parana, Brazil. Theriogenology. 2002; 57 (1): 489.
59. Stringfellow D, Givens M. Manual of the International Embryo Transfer Society. 4 th Edition. Champaign, Illinois USA. Page 87-90 and 141-144, 2013.
60. Cuello C, Sánchez J, Almiñana C, Gil M, Perals M, Lucas X et al. Effect of the cryoprotectant concentration on the *in vitro* embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. Criobiology. 2008; 56: 189-194.
61. Picton H, Gosden R, Leibo S. Cryopreservation of oocytes and ovarian tissue. Gamete source, manipulation and disposition. 2002
62. Díaz C, Muñoz M, Caamaño N, Gómez E. Biotecnología de la reproducción: producción de embriones bovinos *in vitro*. Área de Genética y Reproducción. Centro de Biotecnología Animal. SERIDA. 2004. p. 42-45. (sitio en internet) Disponible en: <http://www.serida.org/pdfs/4578.pdf>. Acceso el 15 de febrero de 2016.

63. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The cryotop method, *theriogenology*. 2007; 67:73-80.
64. Carvalho E. Vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores. (tese apresentada junto ao programa de pós-graduação em medicina veterinária para obtenção do título de doutora). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. 2006: 121
65. Guignot F. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA Prod Anim*. 2005; 18 (1): 27-35
66. Mukaida T, Takahashi K, Kasai M. blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique, *reproductive biomedicine online*, 2003, 6: 221-5.
67. Giraldo J, Gómez J, Vásquez N. Efecto de la dimetilformamida sobre la viabilidad posvitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Revista la sallista de investigación*, vol.9, núm. 1, 2012, p.13-20.

ANEXOS

ANEXO 1

Diagrama de la producción *in vitro* y vitrificación de embriones bovinos



ANEXO 2

Clasificación y evaluación de los complejos cúmulus ovocito (coc)³³

CLASIFICACIÓN DE LOS COC		
CLASIFICACIÓN	CALIDAD	CARACTERÍSTICAS
A	Bueno	Completamente rodeado por más de 3 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo (granulado fino y uniforme, sin mostrar espacio previtelino ni vacuolizado)
B	Regular	Rodeado parcialmente por 3 capas de células del cúmulus y con citoplasma irregular.
C	Malo	Desnudo
D	Degenerado	Rodeado por fibrina (con aspecto de tela de araña)

ANEXO 3

Clasificación de embriones según su calidad por la Sociedad Internacional de Transferencia de embriones (IETS)⁵⁹

CODIGO	NOMBRE	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
I	Excelente o bueno	<p>El embrión es simétrico y esférico con blastómeros claramente visibles, de color, tamaño y estructura uniforme. Este embrión es consistente con la etapa de desarrollo esperado y la zona pelúcida está intacta.</p> <p>Las irregularidades debe ser relativamente menores y al menos el 85% del material celular debe estar intacto. El porcentaje restante lo constituyen las células embrionarias con material extruido en el espacio previtelino.</p>
II	Regular	<p>Embriones con moderadas irregularidades en la masa embrionaria con poca presencia de blastómeros desprendidos o blastómeros con irregularidades en tamaño, color y densidad.</p> <p>Al menos 50% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta viable.</p>
III	Malo	<p>Embrión con mayores irregularidades en la masa embrionaria con presencia de blastómeros deprendidos o blastómeros como forma irregular o de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida.</p> <p>Al menos 25% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta viable.</p>
IV	Muerto o degenerado	<p>Embriones degenerados o aquellos con desarrollo retardado con respecto a los demás embriones además de embriones de 1 célula: inviiables. Esta categoría es considerada como no transferible.</p>

ANEXO 4

Capacitación espermática por el gradiente de Percoll

- Primero se prepara el percoll al 90% y luego al 45%, preparados estos dos y a la temperatura adecuada de 36 °C, en un tubo Ependorf de 0.5 ml se agrega 100 µl de percoll al 45% y luego con mucho cuidado y por las paredes 100 µl de percoll al 90%, evitar que se mezclen y se llegara a pasar ello realice la operación nuevamente, para asegurarse que la operación está bien hecha levantar el tubo y observar el menisco que se produce entre las dos concentraciones.
- Luego se agrega 100 µl de semen refrigerado, luego de todo ello se levanta el tubo a contra de luz y observar las 3 capas que se forman.
- La muestra se lleva a centrifugar a 1300 rpm/20 minutos.
- Se elimina el sobrenadante, inmediatamente se adiciona 1 ml de medio de capacitación y se vuelve a centrifugar a 1000 rpm x 10 minutos
- Después se hace el segundo lavado quitando el sobrenadante y agregando 1 ml de medio de capacitación a 1000 rpm por 10 minutos, se saca el sobrenadante y se sobra 200 µl de pellet para inseminar los ovocitos.

ANEXO 5

Preparación de solución salina fisiológica

SOLUCIÓN SALINA 0,9 % para 1 litro

NaCl	9g
Agua destilada	1000ml
Gentamicina (160 mg/ 2ml)	1ml

ANEXO 6
Composición del medio SOF y Capacitación

MEDIO DE MANIPULACIÓN MODIFICADO (50 ml)

NaCl 0,9%	45 ml
SFB	5 ml
Gentamicina (160 mg/ 2ml) (para 50µl = 0,004g)	50 µl

MEDIO DE MADURACIÓN (10 ml)

TCM-199	9 ml
Piruvato	60 µl
SFB	1 ml
FSH-LH	50 µl
Glutamina	20 µl
EGF	10 µl
Estradiol	10 µl
Gentamicina	10 µl
Filtrar con un filtro de jeringa e introducir en la estufa con el tubo ligeramente destapado. Importante: estas deberán permanecer en la incubadora al menos una hora antes de introducir los ovocitos a madurar.	

MEDIO DE FERTILIZACIÓN (10 ml)

TALP-FIV	10 ml
Piruvato	100 µl
Heparina	100 µl
Gentamicina	10 µl
BSA-FAF	30 mg

TALP-(FIV) FERTILIZACIÓN (50 ml)

NaCl	0,3331g
KCl	0,0119 g
CaCl ₂ + 2H ₂ O	0,0147g
MgCl ₂ + 2H ₂ O	0,0051g
NaHCO ₃	0,105 g
NaH ₂ PO ₄	0,0018 g
Lactato de Na	0,093 ml
Rojo fenol	0,0005g
Ajustar PH 7.4	

MEDIO SOF - BASE (200 ml)

NaCl	1258,2 mg
KCl	106,8 mg
KH ₂ PO ₄	32,4 mg
CaCl ₂ + 2H ₂ O	49,6 mg
MgCl ₂ + 6H ₂ O	19,2 mg
NaHCO ₃	421,2 mg
Rojo fenol	0,28 mg
Lactato de Na	94,12 µl
Filtrar y almacenar a 4 °C hasta añadir aditivos	

ADITIVOS SOF (100 ml)

Piruvato	400 µl
Glutamina	200 µl
AAE	2000 µl
AANE	1000 µl
EGF	100 µl
Ac. Cítrico	100 µl
Myoinositol	1000 µl
SFB	2000 µl
Gentamicina	100 µl
BSA- FAF	0,3 g
Importante: estas deberán permanecer en la incubadora al menos una hora antes de introducir los cigotos fertilizados a cultivar.	

MEDIO DE CAPACITACIÓN

TALP-SPERM (40 ml)

NaCl	0,2308 g
KCl	0,0024 g
CaCl ₂ + 2H ₂ O	0,01176 g
MgCl ₂ + 6H ₂ O	0,0089 g
NaHCO ₃	0,084 g
NaH ₂ PO ₄	0,00168 g
Lactato Na	0,148 ml
Hepes	0,10412 g
Ajustar PH 7,4 y filtrar	

MEDIO DE CAPACITACIÓN (50 ml)

TALP-SPERM	50 ml
Piruvato	500 µl
Gentamicina	50 µl
BSA Fracción V	300 mg

ANEXO 7
Colección, traslado y lavado de ovarios del matadero



Matadero de la comunidad campesina de Quicapata
Lugar de recolección de muestras (Ovarios y epidídimo).



Remoción del tracto reproductor de la hembra, después de que los órganos internos se extraigan.



Extracción de ovarios con ayuda de una tijera y/o bisturí



Termo con ovarios en solución salina a 37 °C



Lavado de ovarios tres veces con solución salina estéril atemperada a 37°C

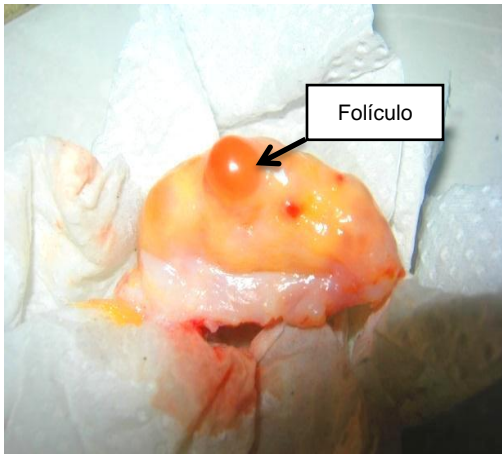


Lavado final de ovarios antes de comenzar el aspirado folicular



Muestra de epidídimo procedente de un toro sacrificado en el matadero

ANEXO 8 Aspiración folicular



Ovario con presencia de folículo



Aspiración con jeringa de 10 ml provista de una aguja N° 18.

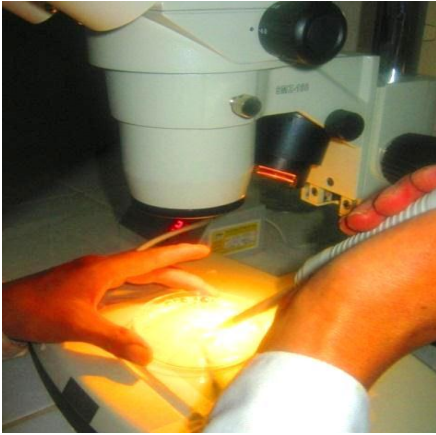


Deposición de líquido folicular aspirado al tubo falcón de 15 ml



Decantación de los ovocitos por 15 minutos a 37 °C en baño María

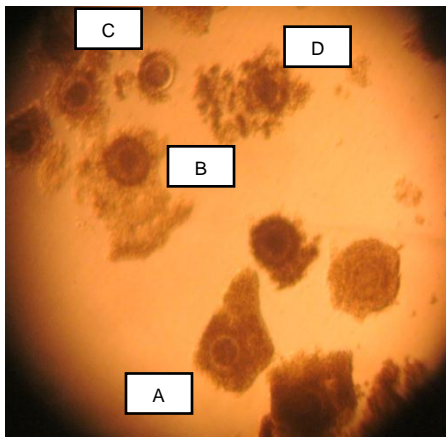
ANEXO 9 Selección y maduración de ovocitos



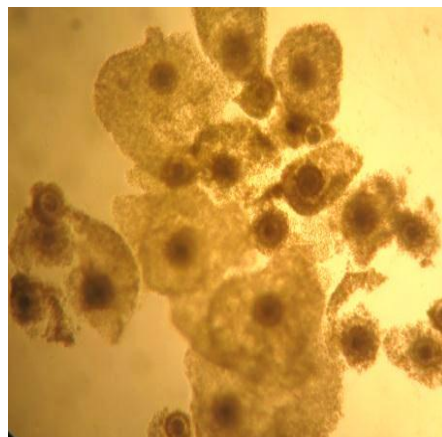
El pellet sobre una placa Petri de 75 mm de diámetro el cual es homogenizado con 2 ml de medio de manipulación



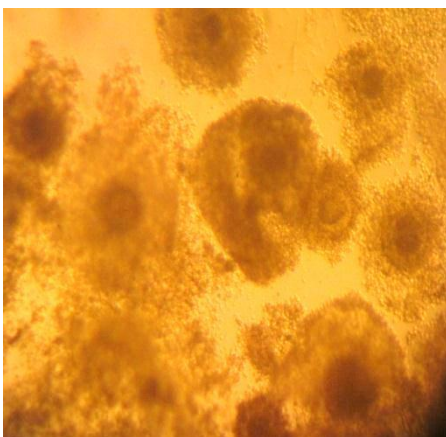
Selección de ovocitos de categoría A y B en el estereoscopio



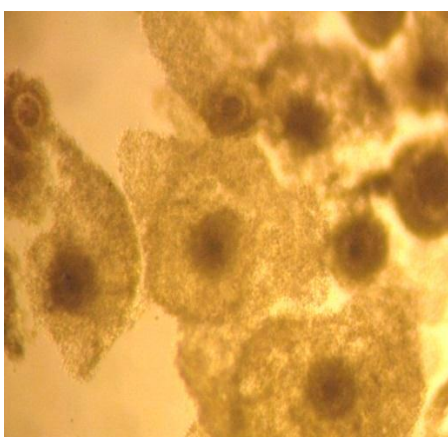
Ovocitos de categoría A, B, C y D vista en el estereoscopio



Ovocitos después de 24 horas puestos a madurar



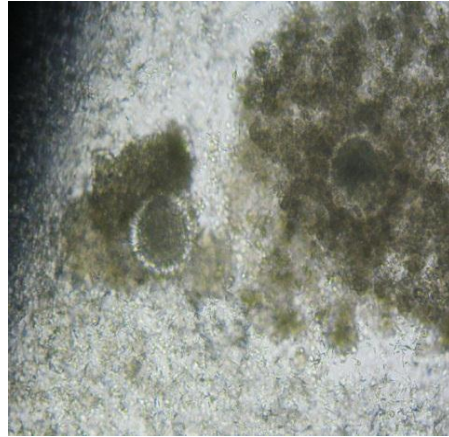
Ovocitos maduros con células de cúmulus bien expandidos vista en el estereoscopio



ANEXO 10
Fertilización y cultivo de cigotos



Medio TAL-FIV para la fertilización *in vitro*



Enfrentamiento entre espermias capacitados y ovocitos madurados

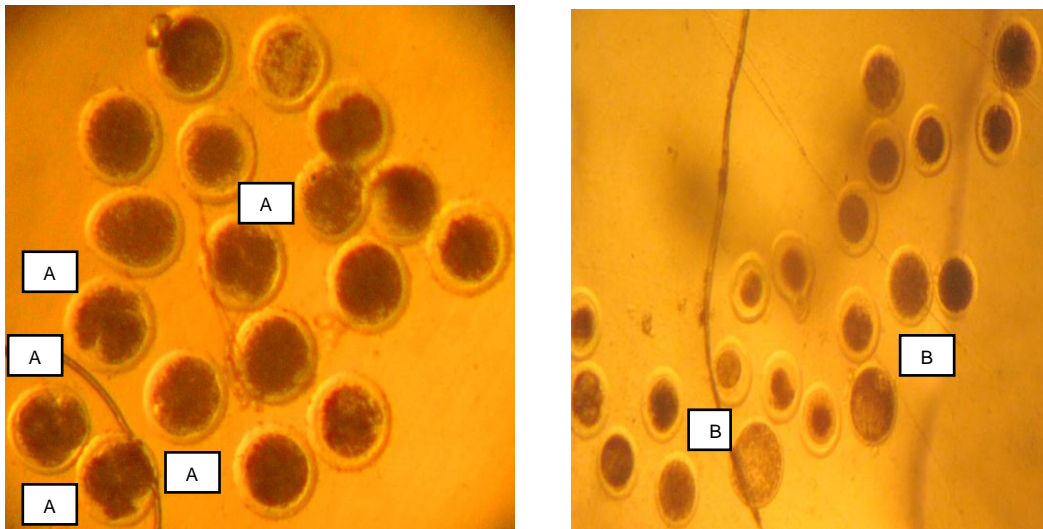


Medio SOF para el cultivo



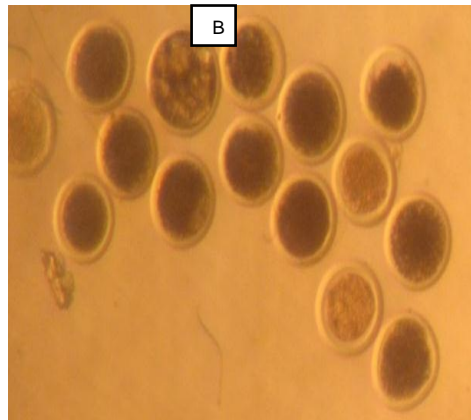
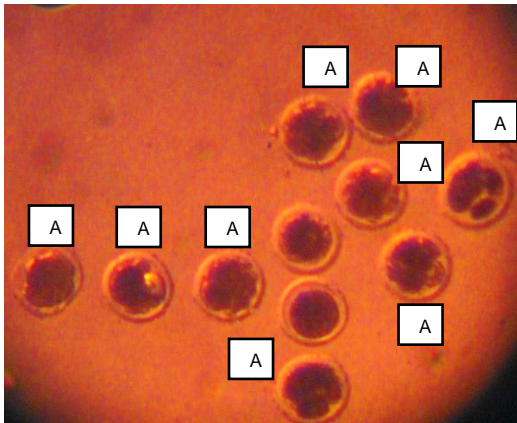
Cultivo en la incubadora de CO₂

ANEXO 11
Embriones bovinos producidos *in vitro*

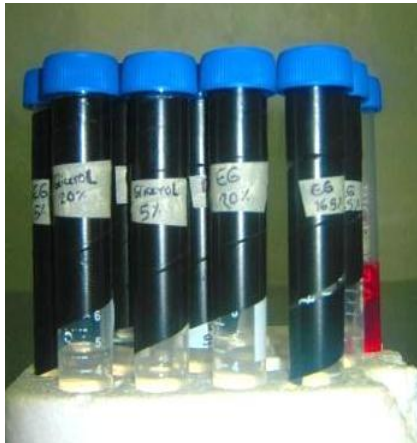


Embriones bovinos producidos y evaluados a los 7 días de cultivo en un medio SOF, en diferentes estadios mórulas (A) y blastocistos (B), vista al estereoscopio

ANEXO 12 Vitrificación de embriones



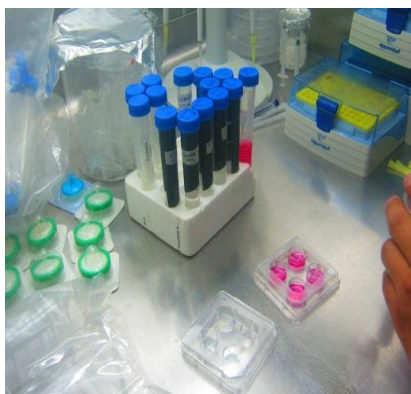
Embriones bovinos seleccionados y aptos para ser sometidos al proceso de vitrificación según el protocolo, mórulas (A) y blastocisto (B)



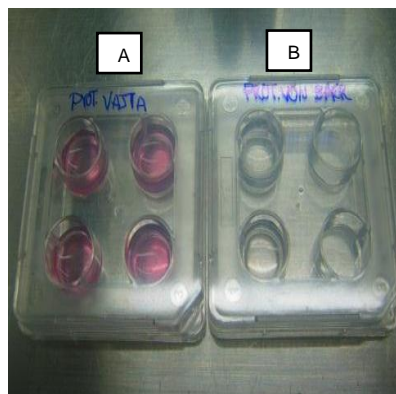
Crioprotectores intracelulares utilizados para vitrificar



Crioprotectores impermeables utilizados para vitrificar



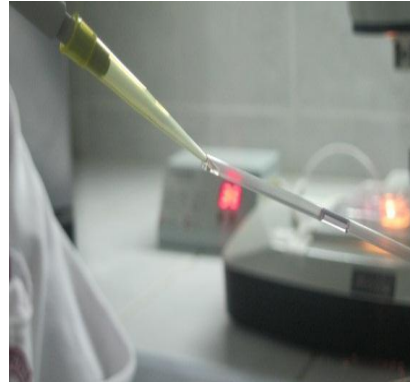
Preparación de medio de vitrificación para ambos protocolos



Medios de vitrificación Vajta (A) y Von Baer (B)



Vitrificación de embriones seleccionados a diferentes concentraciones de crioprotectores



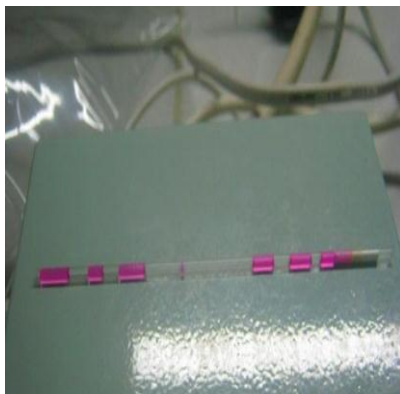
Se carga los embriones sometidos a crioprotectores en pajillas de 0,25 ml



Sellado de la pajilla en alcohol polivinílico



Pajilla sellada según Von Baer lista para ser vitrificado

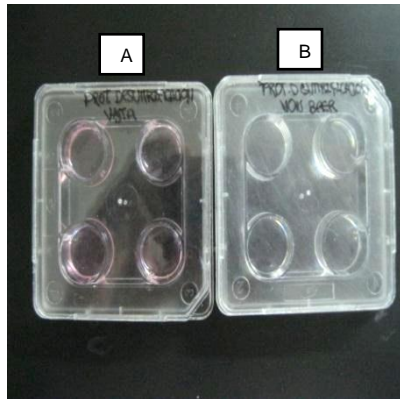


Pajilla sellada según Vajta lista para ser vitrificado



Se sumerge las pajillas en nitrógeno líquido para la vitrificación

ANEXO 13 Desvitrificación de embriones



Medios de desvitrificación
Vajta (A) y Von Baer (B)



Pajillas cargados con los
embriones se retiran del
nitrógeno líquido



Se entibia las pajillas en un
termo a 37 °C



Se procede a secar las pajillas
con papel toalla con mucho
cuidado



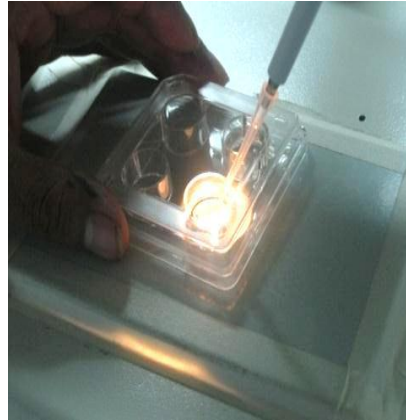
Pajillas secadas conteniendo
embriones



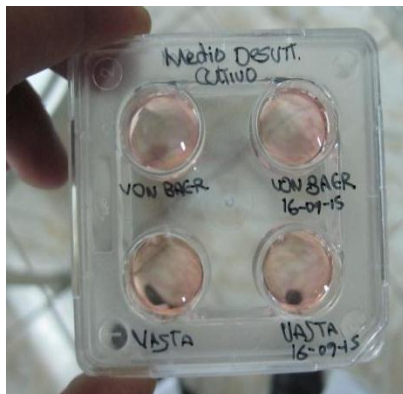
Se procede a cortar con tijera
para facilitar la salida del
embrión



Se descarga los embriones en placas de 4 pocillos conteniendo crioprotectores



Desvitrificación de embriones recuperados a diferentes concentraciones de crioprotectores



Placas de cultivo conteniendo embriones desvitrificados



Cultivo de embriones desvitrificados en la incubadora de CO₂

ANEXO 14

Soluciones stocks necesarios para la preparación de los diferentes medios

Glutamina

Glutamina	0,146 g
Agua mili-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 20 y 200 μ l y congelar a 4°C.	

Piruvato

Piruvato	0,11g
Agua mili-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 110 μ l y congelar a 4°C.	

Myoinositol

Myoinositol	500 mg
Agua mili-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 1ml y congelar a 4°C.	

Fb-Estradiol

FB-Estradiol	222 mg
Agua mili-Q	10 ml
Separar en alícuotas de 30 μ l y congelar a 4°C.	

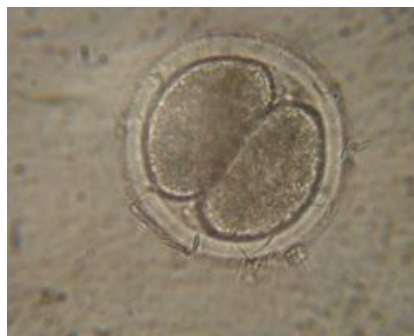
FSH-LH

FSH	0,5mg
LH	0,5mg
TCM-199	1ml
Separar en alícuotas de 20 μ l y congelar a 4°C.	

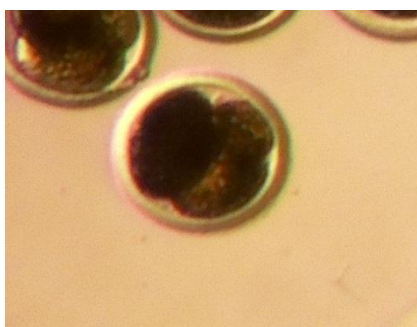
ANEXO 15
Desarrollo *in vitro* de embriones bovinos



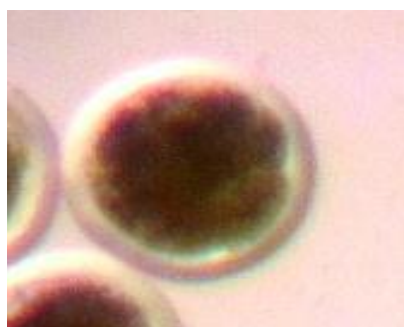
CIGOTO



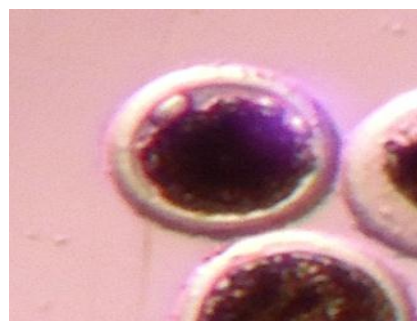
EMBRIÓN DE 2 CÉLULA



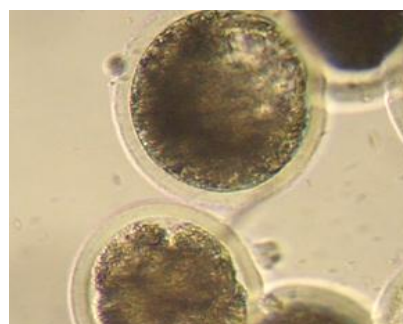
EMBRIÓN DE 4 CÉLULA



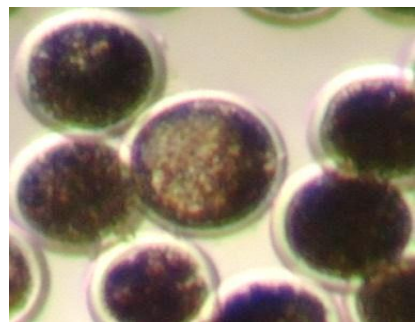
MORULA TEMPRANA



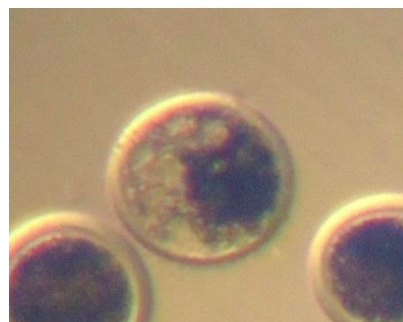
MORULA COMPACTA



**BLASTOCISTOS
TEMPRANO**



BLASTOCISTO

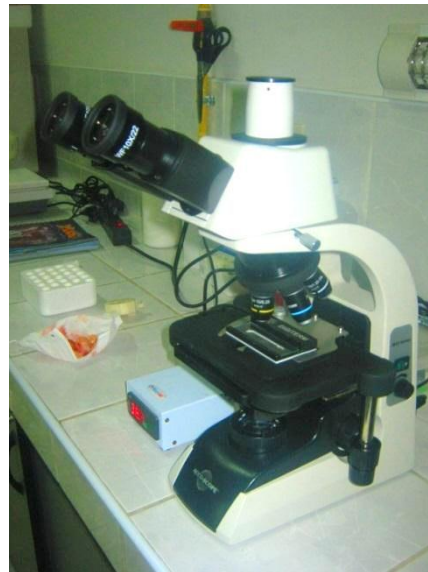


**BLASTOCISTOS
EXPANDIDO**

ANEXO 16
Equipos y materiales de Laboratorio de Biotecnología Reproductiva



Incubadora y tanque de CO₂



Microscopio óptico



Estereoscopio



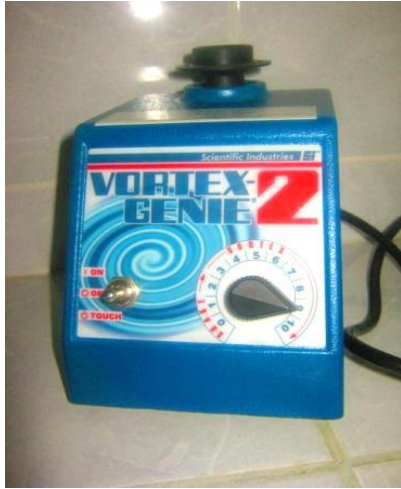
Cámara de flujo laminar



Centrifuga



Refrigeradora



Vortéx



Autoclave



Destiladora



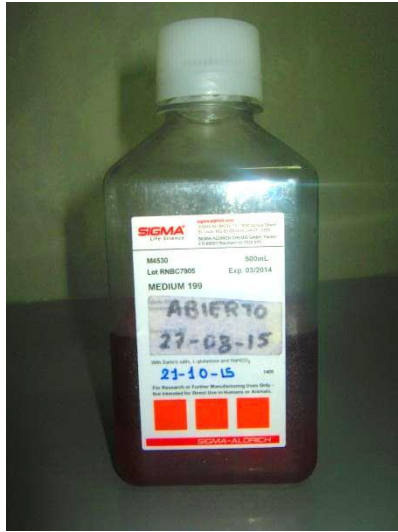
Baño María



Tanque de N₂



Frasco de SFB



Frasco de TCM-199



Medios de cultivo FIV

ANEXO 17
Prueba de T Student para la vitrificación de embriones bovinos con el protocolo Vajta y Von Baer

Estadísticas de grupo					
PROTOCOLO		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
% de embriones recuperados	VAJTA	15	85,1	15,9	4,1
	VON BAER	15	76,2	14,8	3,8
% embriones viables a las 6 horas post desvitrificación	VAJTA	15	27,8	19,6	5,1
	VON BAER	15	49,6	13,6	3,5
% embriones viables a las 18 horas post desvitrificación	VAJTA	15	21,6	18,2	4,7
	VON BAER	15	41,3	14,8	3,8
% embriones degenerados a las 18 horas post desvitrificación	VAJTA	15	78,4	18,2	4,7
	VON BAER	15	58,7	14,8	3,8

ANEXO 18
Vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* por los protocolos Vajta y Von Baer

GRUPO	Protocolo	Fecha	VITRIFICACION	DESVITRIFICACION				EVALUACION VIABILIDAD 6 HORAS			EVALUACION VIABILIDAD 18 HORAS		TOTAL DE EMBRION VIABLE	% TOTAL EMBRION VIABLE		
			TOTAL EMBRION VITRIFICADO	TOTAL EMBRION RECUPERADO	% EMBRION RECUPERADO	MORFOLOGIA DEL EMBRION				MORFOLOGIA					MORFOLOGIA	
						VIABLE	DEGENERADO	% VIABLES	% DEGENERADOS	COMPACTO	DEGENERADO	% COMPACTO			COMPACTO	DEGENERADO
1	Vajta	07/09/2015	4	4	100	1	3	25	75	1	3	25	1	3	1	25
2	Vajta	14/09/2015	6	4	67	2	2	50	50	2	2	50	2	2	2	50
3	Vajta	21/09/2015	4	3	75	2	1	67	33	2	1	67	2	1	2	67
4	Vajta	07/01/2016	6	6	100	2	4	33	67	2	4	33	1	5	1	17
5	Vajta	07/01/2016	6	6	100	1	5	17	83	1	5	17	1	5	1	17
6	Vajta	12/01/2016	6	4	67	2	2	50	50	2	2	50	1	3	1	25
7	Vajta	18/01/2016	9	7	78	3	4	43	57	3	4	43	2	5	2	29
8	Vajta	21/01/2016	8	6	75	0	6	0	100	0	6	0	0	6	0	0
9	Vajta	27/01/2016	7	6	86	1	5	17	83	1	5	17	1	5	1	17
10	Vajta	02/02/2016	8	4	50	0	4	0	100	0	4	0	0	4	0	0
11	Vajta	09/02/2016	3	3	100	0	3	0	100	0	3	0	0	3	0	0
12	Vajta	15/02/2016	7	7	100	2	5	29	71	2	5	29	1	6	1	14
13	Vajta	19/02/2016	6	6	100	2	4	33	67	2	4	33	2	4	2	33
14	Vajta	25/02/2016	8	7	88	2	5	29	71	2	5	29	1	6	1	14
15	Vajta	02/03/2016	13	12	92	3	9	25	75	3	9	25	2	10	2	17
1	Von Baer	07/09/2015	6	6	100	3	3	50	50	3	3	50	2	4	2	33
2	Von Baer	14/09/2015	6	4	67	3	1	75	25	3	1	75	3	1	3	75
3	Von Baer	21/09/2015	3	3	100	1	2	33	67	1	2	33	1	2	1	33
4	Von Baer	07/01/2016	6	5	83	3	2	60	40	3	2	60	2	3	2	40
5	Von Baer	07/01/2016	6	4	67	2	2	50	50	2	2	50	1	3	1	25
6	Von Baer	12/01/2016	6	4	67	2	2	50	50	2	2	50	2	2	2	50
7	Von Baer	18/01/2016	8	6	75	3	3	50	50	3	3	50	2	4	2	33
8	Von Baer	21/01/2016	8	5	63	1	4	20	80	1	4	20	1	4	1	20
9	Von Baer	27/01/2016	6	6	100	2	4	33	67	2	4	33	2	4	2	33
10	Von Baer	02/02/2016	8	4	50	2	2	50	50	2	2	50	2	2	2	50
11	Von Baer	09/02/2016	4	3	75	2	1	67	33	2	1	67	2	1	2	67
12	Von Baer	15/02/2016	7	5	71	3	2	60	40	3	2	60	2	3	2	40
13	Von Baer	19/02/2016	6	4	67	2	2	50	50	2	2	50	2	2	2	50
14	Von Baer	25/02/2016	8	6	75	3	3	50	50	3	3	50	2	4	2	33
15	Von Baer	02/03/2016	13	11	85	5	6	45	55	5	6	45	4	7	4	36

ANEXO 19 MATRÍZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: "Evaluación de dos protocolos para la vitrificación de embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro* utilizando el medio SOF, INIA – Ayacucho"

AUTOR: Emanuel Medina Andía

ASESOR: Blgo. Fidel R. Mujica Lengua

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Evaluación de dos protocolos para la vitrificación de embriones bovinos producidos por fecundación <i>in vitro</i> utilizando el medio SOF INIA- Ayacucho	¿Existirán diferencias entre los dos protocolos de vitrificación para los embriones bovinos producidos por fecundación <i>in vitro</i> utilizando el medio de cultivo SOF?	<p>Objetivo general</p> <p>a. Evaluar dos protocolos para la vitrificación de embriones bovinos producidos por fecundación <i>in vitro</i> utilizando el medio SOF.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <p>a. Determinar el mejor protocolo de vitrificación para embriones bovinos que permitan mejorar la sobrevivencia embrionaria al final del proceso.</p> <p>b. Evaluar la viabilidad de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i>, mediante el análisis de su morfología y re-expansión post desvitrificación a las 6 y 18 horas del cultivo.</p>	<p>2.1. Antecedentes</p> <p>2.2. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos</p> <p>2.3. Etapas en la producción de embriones <i>in vitro</i>.</p> <p>a. Obtención de ovarios y recolección de ovocitos</p> <p>b. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos</p> <p>c. Fecundación <i>in vitro</i> de ovocitos</p> <p>d. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones</p> <p>2.4. Embriones bovinos</p> <p>2.4.1. Evaluación embrionaria</p> <p>2.4.2. Código de clasificación</p> <p>2.5. Vacunos</p> <p>2.6. Criopreservación de embriones bovinos</p> <p>2.7. Vitrificación como técnica de criopreservación</p> <p>2.8. Tipos de crioprotectores</p> <p>2.8.1. Permeables o intracelulares</p> <p>2.8.2. Impermeables o extracelulares</p> <p>2.9. Métodos de almacenamiento para embriones vitrificados</p> <p>2.9.1. Open pulled straw (OPS)</p> <p>2.9.2. El cryolock</p> <p>2.9.3. El cryotop</p> <p>2.9.4. El fibreplug</p> <p>2.9.5. La pajueta clásica</p> <p>2.10. Evaluación de la viabilidad post desvitrificación de embriones</p>	Si existe diferencias en la vitrificación de embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> usando protocolos descritos según Vajta y Von Baer sobre la viabilidad y calidad morfológica de embriones post desvitrificación, siendo los diferentes crioprotectores presentes en cada método de vitrificación los que determinan los requerimientos más óptimos que necesitan los embriones para conservarse y permitir su sobrevivencia.	<p>Variable independiente</p> <p>Protocolo para la vitrificación de embriones bovinos</p> <p>Indicadores:</p> <p>- Protocolo descrito por Vajta</p> <p>- protocolo descrito por Von Baer</p> <p>Variable dependiente</p> <p>Embriones bovinos vitrificados</p> <p>Indicadores:</p> <p>- Calidad morfológica</p> <p>- Tasa de re-expansión</p> <p>- Número de embriones vitrificados.</p> <p>- Porcentaje de viabilidad post desvitrificación.</p>	<p>Tipo de investigación</p> <p>Básica- experimental.</p> <p>Muestreo</p> <p>-Población</p> <p>La población está constituida por los ovarios de vacas sacrificadas en el camal de Quicapata S.A de la ciudad de Ayacucho.</p> <p>-Muestra</p> <p>ovarios colectados <i>post mortem</i> de todas las vacas sacrificadas en el respectivo camal entre julio y noviembre del 2015</p> <p>Instrumentos.</p> <p>- Cámara de flujo laminar</p> <p>- Cámara de CO₂</p> <p>- Estufa</p> <p>- Estereoscopio</p>