

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Evaluación de dos protocolos para la producción *in vitro*
de embriones "bovinos" *Bos taurus* en la región de
Ayacucho, 2012-2013

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIOLOGÍA

Con mención en la especialidad de Biotecnología

Presentado por la:

Bach. PAHUARA FARFÁN, Lariza Evelyn

AYACUCHO-PERÚ

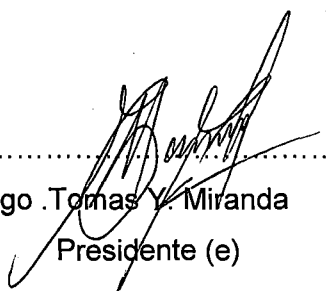
2015

Jurado, puedan deliberar la calificación del trabajo de tesis defendido y deliberado por la Sta. sustentante arribando a los siguientes resultados:

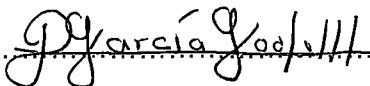
MIEMBROS DE JURADO	Exposición	Respuesta	Promedio
Mg. Javier Ñaccha Urbano	18	18	18
Mg. Paula García Godos Alcazar	20	19	20
Blga. Sonia Palomino Felices	19	19	19
Blgo. Tomas Miranda Tomasevich	18	18	18

Luego de concluido la etapa de calificación la sustentante obtuvo el promedio de la cual dan fé los miembros del Jurado Calificador estampando sus firma al pie del presente acta.

Finalizado el Acto de Sustentación, siendo DIECINUEVE (19). Siendo las seis y diez minutos de la tarde, se concluyó con el presente acto académico.


Blgo. Tomas Y. Miranda
Presidente (e)


Blgo. Mg. Jesús J. Ñaccha U.
Miembro


Mg. Paula García Godos A.
Miembro – Asesora


Blga. Sonia H. Palomino F.
Miembro

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 Joaquín, Bárbara y hermanos, por brindarme el apoyo necesario para poder lograr mi sueño de convertirme en una profesional.

AGRADECIMIENTOS

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 Mg. Paula García Godos Alcázar asesora y al MVZ Mg. Sc. César Augusto Olaguivel Flores coasesor por sus consejos acertados.

A la Estación Experimental Agraria Canaán-Ayacucho, en especial a la Ing.Zootecnista Mari Luz Naveros Flores responsable del P.N.I. en Bovinos por brindarme el acceso y uso del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva.

Al Dr. Teodosio Huanca y Dr. Carlos Emilio Carrasco Badajoz por su asesoramiento.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	9
2.2.1. Importancia de la producción <i>in vitro</i> de embriones	10
2.2.2. Etapas de la producción <i>in vitro</i> de embriones	11
2.3. Medios para la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	18
2.3.1. Medios para la maduración <i>in vitro</i>	19
2.3.2. Medios para la fertilización <i>in vitro</i>	20
2.3.3. Medios para el cultivo <i>in vitro</i>	21
2.3.4. Parámetros biofísicos	24
2.4. Otras definiciones conceptuales	26
2.4.1. Bovinos	26
2.4.2. Ciclo estral	26
2.4.3. La foliculogénesis	28
2.4.4. Dinámica folicular	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Ubicación de la zona de estudio	31
3.2. Población	31
3.3. Muestra	31
3.4. Metodología	32
3.4.1. Recolección de ovarios	32
3.4.2. Aspiración y selección de ovocitos	32
3.4.3. Protocolo I Medio de cultivo KSOMaa	33
3.4.4. Protocolo II Medio de cultivo SOFaa	35
3.5. Análisis de datos	36
IV. RESULTADOS	39

V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 01. Porcentaje de maduración <i>in vitro</i> de ovocitos “bovinos” <i>Bos Taurus</i> , según el protocolo, Ayacucho 2012-2013	40
Tabla 02. Porcentaje de división embrionaria <i>in vitro</i> de “bovinos” <i>Bos taurus</i> a las 48 horas post inseminación en medio KSOMaa y SOFaa, Ayacucho 2012-2013	41
Tabla 03. Producción <i>in vitro</i> de embriones “bovinos” <i>Bos Taurus</i> a los siete días de cultivo en medio KSOMaa y SOFaa, Ayacucho 2012-2013	42
Tabla 04. Clasificación de los embriones “bovinos” <i>Bos Taurus</i> , según su calidad en medio KSOMaa y SOFaa, Ayacucho 2012-2013	43

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 01. Flujograma de la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	64
Anexo 02. Tabla de la clasificación del Complejo <i>Cúmulus</i> Ovocito	65
Anexo 03. Tabla de clasificación embrionaria según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones	66
Anexo 04. Método de separación espermática <i>swim up</i>	67
Anexo 05. Preparación de solución salina fisiológica	68
Anexo 06. Protocolo I Medio de cultivo KSOMaa	68
Anexo 07. Protocolo II Medio de cultivo SOFaa	70
Anexo 08. Composición del medio KSOMaa y SOFaa	72
Anexo 09. Composición del Medio 199	73
Anexo 10. Características morfológicas de la maduración <i>in vitro</i>	75
Anexo 11. Clasificación del Complejos <i>Cúmulus</i> Ovocitos	76
Anexo 12. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones bovinos	77
Anexo 13. Embriones en división a las 48 horas post inseminación	78
Anexo 14. Evaluación de la calidad embrionaria según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones	79
Anexo 15. Registro de la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	82
Anexo 16. Prueba de T Student para la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos con medio de cultivo KSOMaa y SOFaa	83
Anexo 17. Glosario de abreviaturas	85
Anexo 18. Matriz de consistencia	86

RESUMEN

En el estudio se planteó como objetivos determinar el porcentaje de ovocitos madurados, el porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación y el porcentaje de embriones producidos a los siete días de cultivo con medio KSOMaa para el primer protocolo y SOFaa para el segundo protocolo, además de clasificar los embriones según las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. La producción *in vitro* de embriones bovinos fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán–Ayacucho. Se trabajó con una muestra de 1699 ovocitos extraídos por aspiración folicular, utilizados para conformar los dos grupos de estudio. Los ovocitos seleccionados, con tres a más capas de células del *cúmulus* y citoplasma homogéneo, fueron madurados *in vitro* por 24 horas para luego ser fertilizados *in vitro* por 18 horas previo tratamiento espermático con *Swim up* y finalmente cultivados en dos diferentes medios de cultivo por siete días, el primero medio optimizado simple de potasio (KSOMaa) y el segundo medio fluido oviductual sintético (SOFaa) a 38,5°C, 5% de CO₂ en aire y un 95% de humedad relativa. Como resultado de la investigación se obtuvo un 94,46% de ovocitos madurados y un 37,39% de división embrionaria a las 48 horas post inseminación para el primer protocolo y un 96,39% de madurados y 39,19%, de división embrionaria a las 48 horas post inseminación para el segundo protocolo, no existiendo diferencia significativa entre ambos ($p>0.05$). El porcentaje de embriones a los siete días de cultivo fue mejor para el segundo protocolo con SOFaa de 19,63%, con respecto al primer protocolo con medio KSOMaa de 13,06% existiendo diferencia significativa ($p<0.05$). Finalmente los embriones fueron clasificados en cuatro categorías según la IETS. Para KSOMaa se halló 0% de embriones de excelente calidad, 6,32% de regular calidad y 6,84% de mala calidad y con respecto a SOFaa se halló 3,03% de embriones de excelente calidad, 8,69% de regular calidad y de 6,62% de mala calidad, las tres primeras categorías según la IETS lo constituyen los embriones transferibles. La cuarta categoría o intransferible fue de 86,84% para KSOMaa y un 81,66% para SOFaa.

En conclusión el desarrollo de los embriones hasta blastocistos en medio SOFaa es mejor respecto al medio KSOMaa, sin embargo la calidad se encuentra influenciada por la competencia para el desarrollo y las condiciones subóptimas de cultivo, ambas se combina para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad.

Palabras clave: ovocito, embrión y medios de cultivo KSOMaa y SOFaa.

I. INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones bovinos es una tecnología reproductiva que tiene múltiples beneficios, pero la falta de un protocolo que nos permita validar y determinar los principales factores que influyen en la calidad de los embriones al final de la producción constituye un obstáculo. Ya que al desarrollar una técnica supone el obtener al final del proceso un número de embriones producidos y que sean de calidad que justifique su producción.¹

Los ovocitos recuperados de ovarios de vacas beneficiadas en los camales se han convertido en una fuente ampliamente usada por la biotecnología reproductiva para validar protocolos y estandarizarlos.²

Aunque la tasa de maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos es alta aproximadamente de 90 a 80%, la mayoría de ovocitos fertilizados solo se dividen hasta la etapa de dos a cuatro células y no todos son capaces de alcanzar la etapa de blatocisto. Siendo la tasa de desarrollo de blastocisto *in vitro* entre 30 y 40%.³⁻⁴

Esto indica que el cultivo embrionario desde cigoto hasta blastocisto es crítico para la producción *in vitro* de embriones, este momento crítico específicamente se encuentra en el estadio de ocho-dieciséis células en la que se produce la denominada activación del genoma embrionario.¹

Para ello fue necesario transformar los medios de cultivo primitivos, muy complejos y suplementados frecuentemente con suero, en medios más

definidos, en los cuales cada uno de sus componentes pudiera ser estudiado en función del efecto que genera sobre el desarrollo embrionario, su sobrevivencia post criopreservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables.^{4,6}

El proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado son: maduración, fecundación de ovocitos y cultivo de embriones, estos tres pasos comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, donde cada uno condiciona el éxito o fracaso del siguiente.^{1, 4}

En el mercado de embriones producidos *in vitro*, Brasil se ha consolidado un líder absoluto, lo que representa más del 85% del mundo. La producción *in vitro* tiene como fin acelerar la producción de animales genéticamente superiores.⁵

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.⁶

Los objetivos del presente trabajo son:

Objetivo general

1. Evaluar dos protocolos para la producción *in vitro* de embriones "bovinos" *Bos taurus* en la región de Ayacucho.

Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de ovocitos madurados para ambos protocolos de producción *in vitro* de embriones bovinos.
2. Determinar el porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación para ambos protocolos de producción *in vitro* de embriones bovinos.

3. Establecer cuál de los dos protocolos para la producción *in vitro* de embriones bovinos nos permita obtener mayor porcentaje de embriones a los siete días de cultivo con medio KSOMaa para el primer protocolo y SOFaa para el segundo protocolo.
4. Clasificar a los embriones bovinos producidos *in vitro* según su calidad de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

La biotecnología de la reproducción es un conjunto de técnicas que va 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.⁷

Palma y Bremen el 2001, establecieron que las biotecnologías surgieron por generaciones. Estos autores señalan que 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 2000.⁸

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 cultivo 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.⁴

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.^{3, 4} 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

Báez F *et al.* 2010, en su investigación "Evaluación del desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* obtenidos a partir de hembras mestizas" concluye que un total de 802 ovocitos fueron evaluados, siendo el porcentaje de ovocitos madurados de 68,85%, 22,8% ovocitos inmadurados y 8,3% ovocitos degenerados, esta clasificación se realizó según el estadio meiótico alcanzado bajo tinción diferencial. Luego de las 48 horas post inseminación la tasa de división embrionaria fue de 62,61% y a los siete días de cultivo con medio SOF se obtuvo 18,18% de blastocisto, 8,13% de mórulas y 0,24% de blastocisto eclosionado.²

Fernández A *et al.* 2007, en su trabajo Producción *in vitro* de embriones bovinos, concluye que la tasa de fertilización *in vitro* de acuerdo a las características morfológicas del ovocitos a madurar son, que los ovocitos que presentan más de seis capas de células del *cúmulus* expandidas presentan una tasa de fertilización 72%, una tasa de desarrollo embrionario de 35,1%, 14% de mórulas y ningún blastocisto. En el grupo de ovocitos rodeados de cuatro a seis capas de células del *cúmulus*, muestran una tasa de fertilización de 81,8%, una tasa de división embrionaria de 46,3% ,20.8% de mórula y 3,3% de blastocistos. Con respecto a los ovocitos que presentan para el momento de la maduración de dos a tres capas de células, se alcanzó una tasa de fertilización de 76,9%. La tasa

de división embrionaria obtenida fue de 36,8%, 13,1% de mórulas y 2,6% de blastocistos al final del cultivo. En contraste con los ovocitos madurados que presentan muy pocas células del *cúmulus* alrededor o están desnudos, estos presentan una tasa de fertilización mucho menor en el orden del 55,7%, así como una tasa de desarrollo embrionario de 14,7%, de mórulas 1% y ningún blastocisto. Es importante mencionar que la fertilización *in vitro* se llevó a cabo previo tratamiento espermático con *Swim up*. Esto demuestra que 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 del ovocito o remueven los factores que pueden inhibir o suprimir su futuro desarrollo.¹⁰

Ahuja C *et al.* 2009, señala en su investigación Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos, que la tasa de maduración *in vitro* fue de 89,7%, la tasa de división fue de 82,3% para ovocitos cultivados en KSOM y 80,1% para ovocitos cultivados en medio HTF previo tratamiento espermático con Percoll. La tasa de desarrollo de blastocisto fue de 31,6% para embriones cultivados en KSOM comercial y 29,5% para embriones cultivados en HTF comercial.¹¹

Mejía V *et al.* 2009, en su trabajo Evaluación de dos protocolos de cultivo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos, concluyen que las tasas de clivaje o desarrollo embrionario fueron significativamente más altas con medio KSOMaa medio comercial, con una tasa de 83% mientras que para el medio CR1aa fue de 44%. De igual forma, se encontró diferencia entre los blastocistos producidos de 0% y 15% con medio CR1aa y KSOMaa respectivamente.¹²

Wrenzycki C *et al.* 2004, concluye en su trabajo Efectos del sistema de cultivo y la suplementación proteica sobre la expresión mRNA en los embriones de bovino preimplantacionales, que el porcentaje de blastocistos fue similar para ambos

sistemas de cultivo TCM ($21,7 \pm 1,8\%$) y SOF ($21,5 \pm 2,0\%$), sin embargo el porcentaje mejoró significativamente al suplementar el medio con SFB ($30,1 \pm 1,9\%$) que con BSA ($23,9 \pm 1,2\%$) y PVA ($15,9 \pm 1,2\%$). Además que la tensión de oxígeno en el sistema SOF tuvo efecto en las cantidades de transcripciones específicas de embriones bovino.¹³

Nedambale T *et al.* 2004, reporta en su investigación Comparación de embriones bovinos fertilizados *in vitro* en medio SOF y KSOM y su criopreservación por congelación lenta versus vitrificación, que los cigotos con el tratamiento con medio KSOM+ 0,1% BSA durante cuatro días y luego con SOF+5% FCS hasta el noveno día, mejoró la tasa de mórulas en 47%, blastocistos temprano en 26% y a los siete días alcanzó un total de 36% de blastocisto, en comparación con solo el medio KSOM+0,1%BSA observando un desarrollo lento.¹⁴

Quintanilla L. 2012, concluye en su investigación Efecto de la suplementación del medio de maduración con cisteína y dos medios de cultivo en la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos, que la tasa de blastocistos, no difieren entre los medios de cultivo así sea con solo medio KSOM o reemplazado con SOF a los cuatro días de cultivo obteniendo una tasa de blastocisto de 20,88% y 17,95% solo para medio de cultivo KSOMaa (suplementado con y sin cisteína) y de 14,64% y 15,75% para medio de KSOMaa/SOF (suplementado con y sin cisteína).¹⁵

Sagirkaya H *et al.* 2006, reporta en su trabajo El desarrollo y correlación molecular en la pre implantación de embriones bovinos, que la condición de cultivo en medio SOF permite un mayor desarrollo embrionario bovino en la etapa de blastocisto que los medio KSOM y CR1 y en la expresión de los genes embrionarios. Obteniendo una tasa de división embrionaria en medio KSOM, CR1 y SOF de 79, 78 y 80% respectivamente no existiendo diferencia estadística

entre grupos, previo tratamiento espermático con Percoll. En cuanto a la tasa de desarrollo de blastocitos el grupo con medio de cultivo SOF fue significativamente mayor que los de KSOM y CR1, de 32,77 versus 22,67% y 23,08% respectivamente.¹⁶

Hasler J. 2001, en su trabajo Factores que influyen en las tasas de preñez de embriones frescos y congelados-descongelados en bovino, concluye que la calidad de los embriones fue un factor significativo en la tasa de preñez para embriones transferidos en fresco y congelados-descongelados siendo para los embriones de calidad I (73,2%), II (68,3%) y III (56,3%) pero sin reportar diferencia entre los diversos estadios de desarrollo.¹⁷

Shebel R *et al.* 2008, en su investigación Factores que influyen en el éxito de la colección y la transferencia de embriones en grandes hatos lecheros, menciona la correlación directa que existe de la calidad embrionaria sobre la tasa de preñez en hatos lecheros encontrando un 59,4% de preñez para embriones de calidad I, 53,8% para embriones de calidad II y 35,2% para embriones de calidad III.¹⁸

2.2 Producción *in vitro* de embriones bovinos

Esta biotécnica implica las etapas de maduración y fertilización de ovocitos, así como el cultivo de cigotos y embriones.⁵

La producción mundial de embriones *in vitro* y la transferencia en el año 2011 va en incremento. Este fue de 453,471 embriones PIV y 343,927 transferidos, la mayoría de los cuales realizados en Brasil. Aunque no es posible saber los procedimientos utilizados para la FIV en todos los laboratorios involucrados, la mayoría parece estar utilizando algún tipo de procedimiento que consiste en heparina.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 estadio de desarrollo permitiendo el mejoramiento genético.²

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.²⁰

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.²

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 de 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

2.2.2 Etapas de la producción *in vitro* de embriones

a. 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.⁶

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.¹

Maduración nuclear

Es el reinicio de la meiosis desde la etapa de vesícula germinal (profase de la primera división) a la metafase de la segunda división reduccional en la que se detiene una vez más.²³

El arresto meiótico es mantenido durante el desarrollo folicular hasta el estadio de folículo De Graaf. Durante este tiempo el periodo de crecimiento del ovocito se acopla con el de las células foliculares, las cuales interactúan

con las hormonas gonadotroficas y esteroides, como también con otras moléculas intrafoliculares tales como los factores de crecimiento.⁶

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 quedaran en este estadio de metafase II hasta que se produzca la fecundación.¹

Los efectos de la FSH en las células granulosa 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.²⁵

Recolección y selección de ovocitos

Los ovocitos pueden ser colectados de vacas sacrificadas en el camal, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de sus folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm.³

Los ovocitos se obtienen generalmente de folículos antrales mayores a 2 mm y menores a 6-7 mm de diámetro ya que ovocitos de folículos más pequeños carecerían de competencia meiótica en cultivo y los ovocitos de folículos más grandes a menudo se encuentran en procesos de atresia. El mayor porcentaje de fecundación y desarrollo *in vitro* se obtiene con ovocitos de folículos entre 3-7mm.²⁶

La clasificación de los ovocitos colectados se valora de acuerdo a sus características morfológicas como número y compactación de las células del *cúmulus* y el grado de homogeneidad del citoplasma.⁴⁹

Estableciendo cuatro categorías: A (>3 capas), B (< 3 capas), C (desnudado) y D (degenerado) ver anexo 02.

La clasificación morfológica apropiada de los ovocitos es un criterio de selección para una capacidad de desarrollo, por el contrario ningún ovocito desnudado progresa más allá de ocho a dieciséis células.²⁷

b. 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.⁶

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.²⁸

Capacitación espermática y reacción acrosomal

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 la 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.⁶

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.²³

Reconocimiento y fusión de gametos

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.^{6, 24}

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.²³

Formación del pronúcleo

Lo que ocurre *in vivo* al penetrar el espermatozoide la membrana vitelina, es que el óvulo activado completa la meiosis y expulsa el segundo cuerpo polar en el espacio previtelino. Los cromosomas haploides maternos restantes son rodeados entonces por un pronúcleo. Los pronúcleos masculino y femenino migran al centro del óvulo para nuevos arreglos en el armazón citoesquelético del óvulo después de la activación.²³

c. Cultivo 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 ocho a dieciséis células, la compactación de la mórula en el día cinco y la formación del blastocisto al día seis ó siete. 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.¹¹

Expresión del genoma embrionario

Se entiende por expresión del genoma embrionario al momento cuando el desarrollo embrionario depende de la regulación de su propio genoma. El desarrollo de los embriones puede dividirse en dos fases, basado en la conducción genómica de la expresión génica. La primera fase está caracterizada por el control del programa materno en la producción de macromoléculas acumuladas en el ovocito durante la ovogénesis. La segunda fase se inicia cuando el genoma embrionario es activado, de esta forma el desarrollo embrionario es controlado por su propio genoma. Estos periodos están separados por un momento de transición materno-embrionario, en el cual las transcripciones maternas se agotan y el genoma embrionario produce las propias.⁶

Se cree que la habilidad de los ovocitos para convertirse en embriones depende de la acumulación de información específica en forma de ARNm o

proteínas. Este cambio se hace visible a los cuatro días después en el estadio de ocho células, en donde el ovocito acumula ARNm estable y que la acumulación requiere una máquina de transcripción activa.²⁹

Desarrollo embrionario temprano

La segmentación o división embrionaria, es un proceso después de la fecundación, los cigotos experimentan varias divisiones mitóticas. Esta secuencia de duplicaciones continúa durante el resto del periodo de segmentación temprana, 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 16 blastómeros, se denomina mórula.²³

La mórula compacta, es visible al quinto y sexto día 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 previtelino.⁶ Durante esta etapa las células embrionarias cambian de esférica a una forma poligonal. Este fenómeno se denomina compactación, durante la compactación, las células pueden comunicarse entre sí mediante uniones especiales. La compactación es una excelente señal de que el embrión se está desarrollando normalmente.³⁰

El blastocisto temprano, es visible a los siete días, el número de blastómeros es de 100-200 células. Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas o trofoblasto y por la formación de una cavidad llamada blastocele en el interior del embrión.⁶

La formación del blastocele se produce por la liberación al espacio extracelular de secreciones, metabolitos e iones producidos por los

blastómeros. La acumulación de estas sustancias provoca una pequeña cavidad dentro de la mórula que va incrementando y desplazando a los blastómeros a posiciones periféricas quedando esta cavidad central llamada blastocele. En este momento deja de considerarse mórula y se denomina blastocisto.²⁸

El blastocisto, es visible entre el día siete y ocho del cultivo, el número de blastómeros es de 100-200 células. Existe una marcada diferencia entre las células del trofoblasto, que constituye una pared que se adosa a la zona pelúcida y la masa celular o disco embrionario.⁶

El blastocisto expandidos, visible entre el día siete y ocho 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.⁶

El blastocisto protruido, visible el día ocho y nueve, con 200 a 800 células, los embriones han abandonado la zona pelúcida. Su forma puede ser esférica, con un blastocele bien definido o colapsado. Los blastocistos protruidos pueden ser igualmente transferidos, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos, razón por la cual se acostumbra a transferir estadios de mórulas compactas a blastocistos.⁶ Ver al anexo 12 sobre el desarrollo embrionario *in vitro* en bovinos.

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.⁶

Algunas de las características que se analizan para calificar a los embriones se describen a continuación: forma del embrión, color, textura de la masa celular, número y compactación de las blastómeras, diferenciación del tamaño entre blastómeras, tamaño del espacio perivitelino, presencia de blastómeras sueltas, degeneradas o detritus celulares, presencia y tamaño de vesículas (indican degeneración) y apariencia de la zona pelúcida.³¹⁻³²

Código de clasificación

De acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de transferencia de embriones, el código para clasificar la calidad embrionaria se basa en la integridad morfológica de los embriones. Los códigos de calidad embrionaria varían de uno a cuatro como se explica en el anexo 03.

2.3 Medios para la producción *in vitro* de embriones bovinos

Los medios utilizados en las diferentes etapas de producción *in vitro* están formulados en base a la presencia de iones, azúcares y aminoácidos en el ambiente uterino y oviductual, en el momento de la liberación del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Por ello que se sigue desarrollando sistemas de cultivo más definidos y eficientes, sin ningún producto biológico como el uso de suero o células somáticas ya que constituyen la principal fuente de inconsistencia debido a su composición muy compleja y fuente potencial de contaminación con agentes víricos infecciosos.³³

2.3.1 Medios para la maduración *in vitro*

El medio más tradicional y exitosamente empleado en la maduración de ovocitos bovinos es el TCM-199 compuesto por sales Earle's con L-glutamina y bicarbonato de sodio, como estabilizador de pH y suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas.⁶ Sus componentes se describen detalladamente en el anexo 09.

Inicialmente fue diseñado para satisfacer las necesidades de las células somáticas durante prolongados periodos de cultivo. Sin embargo, no es el más apropiado para las necesidades complejas y dinámicas de los ovocitos en maduración.³

Suplementación hormonal

Tiene un efecto positivo sobre el porcentaje de *cúmulus* ovocito que son capaces de completar la maduración meiótica con el consecuente desarrollo *in vitro*.³³

Las hormonas gonadotróficas LH y FSH se emplean en la mayor parte de los protocolos de maduración *in vitro*. Las células que conforman el *cúmulus* liberan enzimas proteolíticas que alteran la estructura polisacárida de los puentes celulares cambiando sus propiedades físicas. El *cúmulus* se torna laxo y adherente, propiedad que le permite ser atrapado por las fimbrias del oviducto y la penetración del espermatozoide en el momento de la fecundación.⁶

La FSH actúa en la maduración *in vitro* a través de las células del *cúmulus*, estimulando la producción de ácido hialurónico y la expansión de estas células, el cual facilita la capacitación espermática, mejorándose así la fertilización y el desarrollo embrionario. La LH estimula la progresión de la meiosis en el ovocito del estado de profase a metafase II.³⁴

2.3.2 Medios para la fertilización *in vitro*

Los diferentes medios que se utilizan en esta etapa se usan para la preparación de los espermatozoides y la fertilización, estos se componen básicamente de una solución TL y solución TALP modificada esta última suplementada con fuentes energéticas como piruvato y lactato además de albumina sérica.³⁵

En la especie bovina, la capacitación espermática se ve favorecida por la incorporación de heparina al medio.³⁶

La heparina es un glucosaminoglicano e induce la capacitación, que finaliza en la reacción acrosomal y permite la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida. En resumen la heparina se asocia al espermatozoide provocando cambios en su membrana plasmática y alterando los sacáridos presentes en su superficie, incrementando los niveles intracelulares de AMPc, Ca^{2+} y eleva el pH intracelular. Eliminando de este modo los factores descapacitantes presentes en la membrana plasmática del espermatozoide.²³

Específicamente la heparina se asocia con una serie de proteínas del plasma seminal bovino. Estos últimos interactúan con el colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática, lo que provoca cambios de los componentes de la superficie del espermatozoide. Luego de la pérdida de las proteínas seminales plasmáticas debido a la unión con la heparina.¹⁹

La concentración de heparina de 10 ug/ml y semen de 1×10^6 espermatozoides /ml arrojan las mejores tasas de penetración de ovocitos bovinos *in vitro*, cuando se utiliza la técnica de *Swim up*. Por lo tanto se recomienda el uso de esta concentración de heparina en la suplementación del medio de fertilización y de esta dosis inseminante, para alcanzar buenas tasas de fertilización con bajos porcentajes de poliespermia.³⁷

Métodos de preparación del semen *in vitro*

Tienen como objetivos separar los espermatozoides del líquido seminal o de los diluyentes que la componen y obtener espermatozoides con un mínimo de 70% de motilidad progresiva y vigorosa.⁶

La gradiente de Percoll, la técnica de *Swim-up*, la migración a través de una columna de ácido hialurónico y la filtración a través de lana de vidrio son técnicas indispensables dentro de la fertilización *in vitro* bovina que permite la selección de una subpoblación espermática que presente una buena motilidad, otra técnica adicional es la capacitación espermática de esta subpoblación seleccionada que se puede realizar mediante el uso de sustancias fisiológicas como el fluido oviductual, la progesterona, las proteínas de la zona pelúcida y los glicosaminoglicanos como la heparina.³⁸

El técnica de *Swim up*

La técnica se basa en la capacidad migratoria ascendente de los espermatozoides incubados en medio a 37°C por sus propios movimientos. Los espermatozoides obtenidos después del tratamiento son altamente móviles, la desventaja es el bajo rendimiento cuantitativo porque requiere más de una pajuela de semen. Esto es debido a que el ascenso de los espermatozoides no depende solamente de su motilidad sino también de la superficie disponible para su ascenso durante el tiempo de incubación.⁶

2.3.3 Medios para el cultivo *in vitro*

Los medios más usados para el cultivo *in vitro* de embriones bovinos son el medio fluido oviductal sintético cuya composición fue establecida por Tervit y colaboradores en 1972 en base a los componentes encontrados en el fluido oviductual ovino y el medio optimizado simple de potasio por Liu y Foote en

1995. Los que son suplementados con numerosos componentes para satisfacer las necesidades nutricionales de los embriones.³⁶

Suplementación con fuentes energéticas

Las fuentes de energía más comunes en el medio de cultivo son el lactato, el piruvato y la glucosa. Estos substratos se han encontrado en el líquido oviductal, sus función difieren en los medios de cultivo de las diferentes especies animales y en los diferentes estadios de desarrollo. En los estadios más tempranos se utiliza el piruvato y/o lactato pero no la glucosa.^{4, 33}

Se ha demostrado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizarían perfectamente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa posteriormente. Sin embargo, a partir del estadio de ocho a dieciséis células y en respuesta de una alta demanda energética necesaria para la compactación, formación y expansión del blastocelo los embriones bovinos utilizan la glucosa como fuente.⁶

Suplementación proteica

Tanto el suero fetal bovino y de albumina sérica bovina, tiene un papel similar, aunque no del todo conocido ambos están compuestos de una forma muy variable, debido a la escasa definición de sus componentes. El SFB y el BSA afectan al pH del medio y actúan como quelantes de iones metálicos, contienen factores de crecimiento y ciertas cantidades variables de hormonas que inciden en la proliferación y diferenciación celular, además sirven como agentes activos de superficie.^{4, 33}

Se ha observado que la suplementación con suero exhibe un efecto bifásico, con la inhibición de las primeras divisiones y estimula la compactación de las mórulas y formación de blastocistos.^{4, 39}

Suplementación con aminoácidos

Normalmente estos sirven como fuente de energía, tampones celulares del pH, y como “pool” para la síntesis proteica. Mucho de los aminoácidos nutricionales, como la fenilalanina, tirosina, lisina, valina y treonina son apenas utilizados por las células embrionarias, mientras que otros, como la glutamina, son activamente metabolizados y muy utilizados como fuente energética durante el desarrollo embrionario.³³

Suplementación con vitaminas

Cumplen un papel importante como coenzimas en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos, igualmente las vitaminas hidrosolubles son necesarias para la expansión del blastocisto y la salida de la zona pelúcida en los embriones de hámster y de conejo. La colina e inositol, incluidas como vitaminas juegan un papel de substrato más que de catalizadores.³³

Antibióticos

Los medios de cultivo suelen ser complementados con 0,1% de antibióticos para suprimir el crecimiento de microorganismos contaminantes y para prevenir la expansión de patógenos.³³

Medio de cultivo SOF y KSOM

Los medios más usados para el cultivo *in vitro* de embriones bovinos son: el medio CR1 (Charles Rosenkrans 1), el medio SOF (fluido oviductal sintético) y el KSOM (Medio optimizado simple de potasio). Los que son suplementados con nutrientes para un mantenimiento adecuado de los embriones en desarrollo.¹¹

El fluido oviductual bovino contiene bajos niveles de Na y altos niveles de K comparado con el plasma sanguíneo, sin embargo esta cantidad varia con las etapas del ciclo estral.³³

Los análisis bioquímicos muestran que el fluido oviductual es un medio complejo constituido por una sutil mezcla de un exudado de sustancias derivadas del plasma sanguíneo, de productos específicos de secreción de origen epitelial y de los fluidos foliculares y peritoneales. Algunos componentes del fluido oviductual como iones, albúmina, inmunoglobulinas, glucosa y piruvato se consideran que son transferidos de la sangre, mientras que un número de proteínas específicas del oviducto son sintetizadas por las células epiteliales.³⁶

La composición de los dos medios de cultivo para la producción *in vitro* de embriones bovinos es muy similar y sólo se encuentra entre ellas ligeras diferencias¹² para ello ver el anexo 08.

2.3.4 Parámetros biofísicos

Temperatura

La más utilizada, tanto en la maduración con en la fecundación y cultivo de embriones *in vitro* se encuentra cercana a la temperatura corporal del bovino que es de 39°C.³³

pH

La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados *in vitro* se desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7,2 y 7,6.⁴

La adición de 10% de suero o un 0,3% de BSA produce una tendencia a bajar el pH en un 0,1. Como muchos medios para cultivos durante largos periodos de tiempo son fosfatados el nivel de este bicarbonato controla el pH. Estos

medios son normalmente equilibrados con gas en el que se va a realizar el cultivo; generalmente 5% CO₂ en aire, lo cual mantiene el pH alrededor del 7,4. El dióxido de carbono resulta necesario para la regulación el pH intracelular y la presencia de bicarbonato se ha visto que incrementa el pH intracelular de los espermatozoides bovinos.³³

CO₂ y O₂

La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% de CO₂ en aire para la maduración y fertilización y 5% CO₂, 90%N₂ y 5% O₂ para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas.⁴

Agua

Es el componente que participa en la mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo, y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario.⁴

No está recomendado el almacenamiento del agua pura, ya que con el paso del tiempo puede llegar a deteriorarse, mayormente debido a la disolución de metales pesados procedentes de los recipientes, bien sean de cristal como de plástico. Ha quedado demostrado que el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto es mayor en los medios preparados con agua fresca milli-Q que en aquellos preparados con agua guardada durante una a dos semanas.³³

Osmolaridad

La osmolaridad normal del suero sanguíneo y de la mayoría de los medios de cultivo es alrededor de los 308mOsm. Sin embargo osmolaridades más bajas se han encontrado óptimas para los medios de cultivo de embriones de rata y medios dentro del rango de los 275 a 285 mOsm se han usado para el cultivo

de embriones bovinos en muchos laboratorios. Se acepta que los embriones pueden tolerar un amplio rango de osmolaridad si la relación potasio: calcio se mantiene constante.³³

Aceite mineral

El cultivo de embriones bajo aceite mineral, permite detoxificar las gotas del medio, las toxinas liposolubles se concentran más en el aceite que en la fase acuosa (medio) y el aceite crea una barrera entre el medio y la atmosfera, lo que disminuye la probabilidad de que los solventes hidrofóbicos puedan alcanzar altas concentraciones en el medio.⁴⁰

2.4 Otras definiciones conceptuales

2.4.1 Bovinos

El ciclo sexual de la vaca suele ser independiente de la estación del año. El estro o celo se observa cada 21 días en promedio, con un rango de 18 a 24 días. La ovulación se da unas 30 horas después del inicio el estro.⁴¹

2.4.2 Ciclo estral

En la especie bovina, el ciclo estral tiene una duración media de 21 días en las vacas y 20 días en las novillas, considerándose normal siempre que este comprendido entre 18 y 24 días. En el transcurso del ciclo estral los ovarios sufren una serie de cambios que finalizan con la ovulación y la expulsión de un ovocito capacitado para ser fecundado por un espermatozoide. Estos cambios están regulados por diversas hormonas.⁴²

- Proestro, periodo que dura tres días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación del celo. Al producirse la destrucción del cuerpo lúteo tenemos una caída en los niveles de progesterona y posteriormente una pérdida de tejido lúteal, siendo la

prostaglandina de origen uterino el principal luteolítico en los animales domésticos.⁴³

Durante esta fase, la hembra se encuentra bajo la influencia de dos hormonas hipofisiarias: la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante⁴⁴.

La FSH, es responsable del inicio de la oleada de crecimiento folicular al estimular el reclutamiento, mientras que la LH interviene en la maduración final del folículo dominante y en la ovulación. Ambas sustancias actúan coordinadamente en la regulación de la secreción de estrógeno por las células de la granulosa.⁴²

- Estro, es la etapa más visible del ciclo y comienza con la receptividad al macho e involucra todos los cambios que permiten la ovulación. En el estro tiene corta duración de 15 a 18 horas pero con un amplio rango que va desde 8 a 30 horas y con múltiples factores que condicionan este rango como genotipo, edad, temperatura, stress, presencia de otras vacas en celo, presencia del toro, etc. Es el momento más reconocible del ciclo estral porque se caracteriza por un comportamiento visible, el estrógeno es la hormona dominante durante esta etapa.⁶
- Metaestro, es el periodo de transición de la dominancia de estrógeno a la de progesterona. En este periodo ocurre la ovulación de la vaca a las 28 a 32 horas de iniciado el celo, después de la ovulación, lo que queda del folículo se transforma en el cuerpo lúteo que secreta progesterona y prepara al tracto reproductivo para la gestación.⁴⁵
- Diestro, es el periodo de máxima función lútea. El diestro es la etapa más larga del ciclo estral y es el periodo donde el cuerpo lúteo es totalmente funcional y la secreción de progesterona es alta. Esta termina cuando el cuerpo lúteo es destruido. Si la fertilización falla, el cuerpo lúteo involuciona

alrededor de 16 días después del último calor, permitiendo que otro folículo madure y libere un óvulo nuevo.⁴⁵

Las hormonas que intervendrían en la síntesis de progesterona son la FSH. La FSH se une a receptores ubicados en el cuerpo lúteo y provocaría un aumento en la secreción de progesterona.⁴³

2.4.3 La foliculogénesis

Proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular. Abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo preovulatorio.⁵⁰ Donde usualmente solo un folículo asume dominancia y el destino del resto de los folículos es la atresia mediada por apoptosis.²¹ Este comienza en la vida fetal con la formación de folículos primordiales que a su vez entran a la reserva de folículos en crecimiento (preantrales y antrales).⁶

Después de la reanudación del desarrollo se forman los folículos primarios, compuesto por ovocitos en crecimiento activo, el ovocito se encuentra rodeado por una capa unilaminar de células de la pre-granulosa. Entre ellos se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida.²⁵

Cuando el folículo presenta dos o más capas de células granulosas cuboidales se denominan folículo secundario. El paso siguiente es la formación del antro, el número de folículos antrales o terciarios depende del nivel de gonadotrofinas.⁶

2.4.4 Dinámica folicular

Es un proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio. Una onda de crecimiento folicular está caracterizada por presentar las fases de reclutamiento, selección,

dominancia y atresia folicular, esta última está presente sólo en aquellos folículos no ovulatorios.⁴³

- La fase de reclutamiento, está dada por el desarrollo de un grupo de folículos primordiales que comienzan a madurar bajo un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permitan avanzar a la ovulación.
- La fase de selección, es el proceso por el cual un folículo evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación.
- La fase de dominancia, es proceso por el cual el folículo seleccionado ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de un nuevo grupo de folículos⁵⁵. Este folículo dominante alcanza un tamaño marcadamente superior, mayor de 10 mm, y ejerce un control del desarrollo de los demás folículos a través de hormonas como estradiol, inhibina, activina, folistatina y factores de crecimiento actuando en forma local o sistémica.⁴³

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación de la zona de estudio

El presente estudio se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA, distrito de San Juan Bautista provincia de Huamanga departamento de Ayacucho.

3.2 Población

La población de estudio comprendió todos los ovocitos colectados por aspiración folicular a partir ovarios de vacas sacrificadas en el centro de beneficio Quicapata S.A. 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 centro de beneficio Quicapata S.A. ir al anexo 11 para observar la clasificación de los complejos *cúmulus* ovocitos.

Sistema de muestreo

La selección de los ovocitos de categoría A y B (buenos y regulare) 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

- Los ovarios bovinos obtenidos de vacas sacrificadas en el camal, fueron transportados en solución salina (NaCl al 0,9%) suplementada con antibióticos a una temperatura de 37°C, ir al anexo 05 para ver la preparación detallada. A esta temperatura, los ovarios permanecen en el termo hasta aproximadamente dos a tres horas sin afectar significativamente los resultados posteriores.

3.4.2 Aspiración y selección de ovocitos

- En el laboratorio los ovarios fueron lavados tres veces con solución salina fisiológica atemperada a 37°C, con el fin de retirar el material contaminante, sangre y detritus.
- Se procedió luego a la aspiración folicular mediante la punción de folículos de 2-7 mm de diámetro, con una jeringa de 10ml provista de una aguja N° 20. Teniendo en cuenta de no aspirar folículos menores a 2 mm ni mayores a 7mm 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 y se dejó decantar los ovocitos por aproximadamente 12 a 15 minutos a 37°C, para luego retirar

el sobrenadante. El pellet formado se retiró con ayuda de una pipeta de Pasteur.

- Se colocó el pellet sobre una placa de búsqueda de 75mm de diámetro el cual fue homogenizado con el medio de lavado.
- Luego se realizó la selección del complejo *cúmulus* ovocito de categoría A y B, con ayuda de un estereoscopio y una micropipeta, para ver las características de la selección de los ovocitos ir al anexo 02.

3.4.3 Protocolo I Medio de cultivo KSOMaa (Medio optimizado simple de potasio)

Maduración *in vitro*

- Los ovocitos seleccionados, fueron lavados tres veces mediante el pasaje en gotas con medio de lavado (premaduración), posteriormente se procedió a un último lavado con medio de maduración.
- Finalmente se depositó 10 ovocitos/50µl medio de maduración, cubiertos por completo en aceite mineral.
- La maduración se realizó por un periodo de 24 horas a 38,5°C, con 5% de CO₂ en aire y 95% humedad relativa.

Fertilización *in vitro*

- Los ovocitos con células del *cúmulus* bien expandidos, signo de una buena maduración ovocitaria (ir al anexo 10), fueron seleccionados y lavados tres veces nuevamente mediante el pasaje a través de gotas utilizando el medio de lavado y seguidamente se procedió a un lavado final con el medio de fecundación.
- Luego se depositó 10 ovocitos/50µl medio de fertilización, cubiertos por completo en aceite mineral.
- Previamente los espermatozoides bovinos fueron tratados con la técnica de *Swim up* (ver anexo 04)

- Se añadió luego a los ovocitos pre incubados en medio de fertilización, 2 μ l de la suspensión espermática previamente tratada a una concentración final de 1 a 2 x10⁶ espermatozoides/ml.
- Luego fueron cocultivos por 18 horas 38,5°C con 5% de CO₂ en aire y 95% humedad relativa.

Cultivo *in vitro* de embriones

- Después de las 18 horas de fertilización los presuntos cigotos fueron colocados en medio de lavado y agitados durante siete minutos en el vortex con la finalidad de remover los espermatozoides y el restante de células del *cúmulus* que rodean al cigoto.
- Luego los presuntos cigotos fueron nuevamente lavados tres veces mediante el pasaje a través de gotas y en el último lavado se empleó el medio de cultivo.
- Finalizado el lavado se cultivó 10 cigotos/50 μ l de medio KSOMaa cubierto por completo en aceite mineral.
- El cultivo se mantuvo por siete días a 38,5°C, con el 5% de CO₂ en aire y 95% humedad relativa.
- La preparación de los diferentes medios para este protocolo se especifica en el anexo 06.
- Finalizado el cultivo por siete días se evaluó el número de embriones (en estadio de mórulas y blastocitos) y se clasificó a los embriones acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, para ello ver el anexo 14 de la clasificación embrionaria.

3.4.4 Protocolo II Medio de cultivo SOFaa (Fluido oviductal sintético)

Maduración *in vitro*

- Los ovocitos seleccionados, fueron lavados tres veces con medio de lavado. Finalizado el último lavado con medio de maduración se depositó un total de 25 ovocitos/500 µl medio de maduración por pocillo
- Las placas multipocillos con los ovocitos fueron llevados a incubar por 24 horas a 38,5°C, con 5% de CO₂ en aire y 95% humedad relativa.

Fertilización *in vitro*

- Finalizada la maduración se observó al estereoscopio y se seleccionó solo los ovocitos con células del cúmulus bien expandidas (anexo 10).
- Luego con ayuda de una micropipeta se depositó como máximo 25 ovocitos/ 500 µl medio de fecundación por pocillo
- Luego se agregó 20 µl de suspensión espermática previamente tratada con la técnica de *Swim up* (anexo 04) a una concentración final de 1 a 2 x10⁶ espermatozoides/ml.
- Finalmente incubar por 18 horas a 38,5°C, 5% de CO₂ en aire y 95% humedad relativa.

Cultivo *in vitro* de embriones

- Finalizada las 18 horas de fertilización, los presuntos cigotos fueron colocados en medio de lavado y agitados durante siete minutos en el vortex con la finalidad de remover los espermatozoides y el restante de células del *cúmulus* que rodean al cigoto.
- Los cigotos desnudados fueron recuperados y lavados con el mismo medio cultivo para luego ser cultivados. Se colocó aproximadamente 25 presuntos cigotos/500µl de medio de cultivo SOFaa por pocillo, por siete días a 38,5°C, con 5% de CO₂ en aire y 95 humedad relativa.

- La preparación de los diferentes medios para este protocolo se especifica en el anexo 07.
- Al culminar los siete días de cultivo se evaluó el número de embriones (en estadio de mórulas y blastocitos) y se clasificó a los embriones de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, para ello ver el anexo 14 de la clasificación embrionaria.

3.5 Análisis de datos

Se comparó el porcentaje de ovocitos madurados, el porcentaje de división embrionario a las 48 horas post inseminación y el porcentaje de embriones producidos a los siete días (KSOMaa y SOFaa) para ambos protocolos, mediante la prueba estadística de T Student para determinar si existen diferencias estadísticas entre los dos protocolos desarrollados. El análisis fue realizado usando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 21.

En cada una de las etapas de la producción *in vitro* de embriones bovinos se determinó:

El porcentaje de ovocitos madurados

Se halló del número total de ovocitos madurados entre el total de ovocitos puestos a madurar.

$$\%M = \frac{N^{\circ} \text{ ovocitos madurados}}{N^{\circ} \text{ ovocitos}} \times 100$$

El porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación

Se determinó del número total de embriones en división a las 48 horas post inseminación entre el número total de cigotos puestos a cultivar.

$$\% DE = \frac{N^{\circ} \text{ embriones en division}}{N^{\circ} \text{ cigotos cultivados}} \times 100$$

El porcentaje de embriones bovinos después de siete días de cultivo

Se determinó del número total de embriones (en etapa de mórula y blastocito) después de siete días de cultivo entre el número total de cigotos puestos a cultivar.

$$\% E = \frac{N^{\circ} \text{ embriones}}{N^{\circ} \text{ cigotos cultivados}} \times 100$$

El porcentaje de embriones bovinos clasificados de acuerdo a las normas de la IETS

Se determinó del número total de embriones según su calidad: excelente o bueno, regular, malo y muerto o degenerado sobre el número total de cigotos puestos a cultivar.

$$\% CE = \frac{N^{\circ} \text{ embriones de Ci}}{N^{\circ} \text{ de cigotos cultivados}} \times 100$$

Calidad embrionaria (Ci):

Código 1: Excelente o bueno

Código 2: Regular

Código 3: Malo

Código 4: Muerto o degenerado

IV. RESULTADOS

Tabla 01. Porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos “bovinos” *Bos taurus*, según el protocolo, Ayacucho 2012-2013

Protocolo	Nº de ovocitos	Maduración de ovocitos bovinos	
		Nº de ovocitos madurados	Porcentaje de ovocitos madurados
I (KSOMaa)	695	656	94,46% ^a
II (SOFaa)	1004	967	96,39% ^a

^a Literales similares en la misma columna indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$), Prueba T Student.

Tabla 02. Porcentaje de división embrionaria *in vitro* de “bovinos” *Bos Taurus* a las 48 horas post inseminación en medio KSOMaa y SOFaa, Ayacucho 2012-2013

Protocolo	Nº de cigotos cultivados	División de embriones bovinos a las 48 horas post inseminación	
		Nº de embriones en división	Porcentaje de embriones en división
I (KSOMaa)	585	217	37,39% ^a
II (SOFaa)	725	286	39,19% ^a

^a Literales similares en la misma columna indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$), Prueba T Student.

Tabla 03. Producción *in vitro* de embriones “bovinos” *Bos taurus* a los siete días de cultivo en medio KSOMaa y SOFaa, Ayacucho 2012-2013

Protocolo	Nº de cigotos cultivados	Embriones bovinos a los 7 días de cultivo				Nº total de embriones	%
		Nº de mórulas compactas	%	Nº blastocistos	%		
I (KSOMaa)	585	8	1,42%	69	11,64%	77	13,06 % ^a
II (SOFaa)	725	16	1,97%	117	17,66%	133	19,63 % ^b

^{a, b} Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$), Prueba T Student.

Tabla 04. Clasificación de los embriones “bovinos” *Bos taurus*, según su calidad en medio KSOMaa y SOFaa, Ayacucho 2012-2013

Protocolo	N° de cigotos cultivados	Clasificación de embriones bovinos según su calidad							
		N ° de embriones de excelente o buena calidad	%	N ° de embriones de regular calidad	%	N ° de embriones de mala calidad	%	N ° de embriones muertos o degenerados	%
I (KSOMaa)	585	0	0	27	6,32	40	6,84	508	86,84
II (SOFaa)	725	22	3,03	63	8,69	48	6,62	592	81,66

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó dos protocolos para la producción *in vitro* de embriones bovinos, a partir de ovocitos obtenidos por aspiración folicular de ovarios colectados del camal, sobre el porcentaje de embriones producidos a los siete días de cultivo en medio KSOMaa y SOFaa respectivamente.

En la tabla 01 se muestra los resultados obtenidos tras la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, señalando que para el primer protocolo se obtuvo un 94,46% de ovocitos madurados y para el segundo protocolo un 96,39%, no existiendo diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$), para ambos protocolos con respecto al porcentaje de ovocitos madurados *in vitro*, utilizando una concentración de 0,1mg FSH, 0,5 mg LH y 1mg/ml de 7 β -estradiol para el primer protocolo y 0,5mg/ml de FSH/LH y 1mg/ml de 7 β -estradiol para el segundo protocolo. Además es importante señalar que en esta primera etapa, se seleccionó para la maduración, los ovocitos que estaban rodeados de tres a más capas de células de *cúmulus* y con un citoplasma homogéneo.¹²

El porcentaje de ovocitos madurados obtenidos en el presente trabajo son superiores a lo reportado por Báez F *et al*, quien obtuvo 68,85% de ovocitos madurados al utilizar 10ug/ml LH y 1mg/ml de estradiol y Ahuja C *et al*, con una tasa de maduración de 89,7% al utilizar 20mg/ml de FSH y 1mg/ml estradiol.^{2,11}

Estas diferencias en el porcentaje se deben al efecto de la FSH y LH en el medio

de maduración, ya sea que se utilicen de forma independiente o en combinación y en diferentes concentraciones, va a conllevar a variabilidad entre los resultados.^{34, 46}

Además, los resultados obtenidos indican que una adecuada clasificación morfológica de los ovocitos es un factor esencial para el sistema de producción de embriones *in vitro*, por el contrario ningún ovocito desnudado progresa más allá de ocho a dieciséis células.²⁷

La presencia de células del *cúmulus* alrededor del ovocito y un citoplasma homogéneo durante la maduración *in vitro* es esencial para el desarrollo del mismo.¹⁰

Por lo tanto la remoción de todas las células de la corona y del *cúmulus* previo a la incubación, se relaciona a una posterior disminución del reinicio meiótico; esto se debe a que los ovocitos desnudados de las células del *cúmulus* son incapaces de responder a la LH y FSH, ya que estas células son las mediadoras del efecto de las gonadotrofinas.^{29, 34}

En la tabla 02 se muestra el porcentaje de la división embrionaria a las 48 horas post inseminación (ver el anexo 13), en esta etapa se evaluó los embriones que entraron en división a las 48 horas post inseminación con espermatozoides capacitados con heparina y lavados previamente con la técnica de *Swim up* para ambos protocolos. Señalando que el porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación para el primer protocolo con medio KSOMaa fue de 37,39% y para el segundo protocolo con medio SOFaa fue de 39,19%, no existiendo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) para ambos protocolos con respecto al porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación.

Los resultados obtenidos de la división embrionaria a las 48 horas post inseminación son inferiores a lo reportado por Ahuja C *et al*, quien obtuvo una

tasa de división embrionaria de 82,3%, Mejía V *et al*, con una tasa de clivaje de 83%, Báez, F *et al*, con una tasa de división embrionaria de 62,61% y Sagirkaya H *et al*, con 79% para KSOM y 80% para SOF respectivamente, esto se da debido a diferencias experimentales en la capacitación espermática con PHE y la heparina, además de la técnica de lavado espermático utilizado comparado con lo desarrollado en este estudio.^{2,11-12,16}

Y similares porcentajes de división embrionaria fue reportado por Fernández, A *et al*, quien alcanzó una tasa de desarrollo embrionario de 35,1%, 46,3%, 36,8% y 14,7% según a las características del ovocito madurado, este estudio se llevó a cabo bajo similares condiciones utilizando la técnica del *Swim up* y heparina como capacitante espermático.¹⁰

La héparina junto a los espermatozoides juegan un papel importante en la etapa de fertilización. La acción *in vitro* de la heparina es desencadenar la capacitación, que finaliza en la reacción acrosomal permitiendo la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida.⁶

Y asimismo se reafirma que la preparación de los espermatozoides para la fecundación *in vitro* afecta al patrón de capacitación y reacción acrosómica.³⁸

En la tabla 03 el porcentaje de embriones producidos a los siete días de cultivo en medio KSOMaa fue 13,06% y en medio SOFaa de 19,63%, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos medios de cultivo ($p < 0.05$).

La composición de los dos medios de cultivo para la producción *in vitro* de embriones bovinos es muy similar y solo se encuentra entre ellas ligeras diferencias. Estos medios son los comúnmente utilizados dentro de la producción *in vitro* de embriones bovinos.¹⁶

El medio de cultivo SOFaa tienen además dentro de su composición ácido cítrico, que mejora el desarrollo de los embriones bovinos, además del myoinositol y SFB, todo lo contrario al KSOMaa no los posee. También, la

concentración de BSA en SOFaa es mayor que en KSOMaa. Estas diferencias podrían tener un efecto en el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto y su calidad.¹²⁻¹³

Existen investigaciones que revelan que la producción *in vitro* de embriones hasta la etapa de blastocisto se ve mejorado con la adición de myoinositol y suplementos proteicos (SFB) como lo reporta Wrenzycki C *et al*, quien concluye que el sistema de cultivo SOF proporciona un ambiente óptimo para el desarrollo en los embriones preimplantacionales y una mayor cantidad de transcripciones específicas en los embriones bovinos. El porcentaje de blastocitos mejoró significativamente al suplementar el medio con SFB ($30,1 \pm 1,9\%$) en contraste con BSA ($23,9 \pm 1,2\%$) y PVA ($15,9 \pm 1,2\%$).¹³ Además Báez F *et al*, obtuvo un porcentaje de 18,18% de embriones en etapa blastocistos, 8,13% para mórulas y para blastocistos eclosionados de 0,24% en medio de cultivo SOF suplementado con 5mg/ml de BSA ,20 ml de EAA, 10 ml de NEAA, 10 ml L-Glutamina y 2,5% de SFB.²

Esta misma tendencia es reportado por Sagirkaya H *et al*, quienes concluye que la condición de cultivo en medio SOF permite un mayor desarrollo embrionario bovino en la etapa de blastocisto que con los medios de cultivo KSOM y CR1 y en la expresión de los genes embrionarios. Donde la tasa de desarrollo de blastocitos, con medio de cultivo SOF fue significativamente mayor que con KSOM y CR1 estas fueron de 32,77% versus 22,67% y 23,08% respectivamente.¹⁶

Las principales diferencias en la producción *in vitro* de embriones bovinos reportado por los diferentes investigadores en contraste con lo obtenido en este estudio, es posible que se deba a que no fue posible encontrar un estudio que se haya realizado bajo las mismas condiciones desarrolladas en el laboratorio. Las diferencias experimentales observadas entre los diferentes investigadores fueron

las siguientes: la utilización de medios comerciales como lo mencionado por Ahuja C *et al*, quien obtuvo 31,6% de blastocistos en KSOM comercial y Mejía, V *et al*, un 15% de blastocistos cultivados en medio KSOM comercial, la renovación del medio de cultivo o la sustitución por otro dentro de los siete días de cultivo. Parecer tener un efecto directo sobre el porcentaje de embriones, según lo mencionado Nedambale T *et al*, quien obtuvo con medio KSOM/0,1% BSA+ SOF/5% FCS una mejor tasa de mórulas de 47% y blastocistos temprano en 26%, en comparación con solo el medio KSOM/0,1%BSA observando un desarrollo lento.^{11-12,14}

Por otra parte Quintanilla L, reporta todo lo contrario concluyendo que la tasa de blastocistos, no difieren entre los medios de cultivo así sea con solo medio KSOM o reemplazado con SOF a los cuatro días de cultivo obteniendo una tasa de blastocisto de 20,88% y 17,95% solo para medio de cultivo KSOMaa (suplementado con y sin cisteína) y de 14,64% y 15,75% para medio de KSOMaa/SOF (suplementado con y sin cisteína).¹⁵

Además la producción *in vitro* de embriones bovinos en el presente trabajo independientemente del protocolo utilizado se ve influenciada por las condiciones del cultivo, como por ejemplo la calidad del agua y la determinación de la osmolaridad. La medida de la osmolaridad es uno de los controles de calidad, imprescindible en un laboratorio que produce sus propios medios, a fin de evitar errores de pesado y dilución de sus componentes, como también para controlar la calidad del agua empleada, ya que esta última tiene un profundo efecto sobre el desarrollo embrionario en cultivo y principalmente sobre su calidad.^{4, 6,33}

Esta última etapa en la producción *in vitro* de embriones bovinos, correspondiente al paso más prolongado dentro del proceso de producción y es

el principal periodo que determina la eficiencia global del sistema, así como calidad de los embriones obtenidos.¹

Se cree que la habilidad de los ovocitos para convertirse en embriones depende de la acumulación de información específica en forma de ARNm o proteínas. Este cambio se hace visible 4 días después en el estadio de 8 células, en donde el ovocito acumula ARNm estable y que la acumulación requiere una máquina de transcripción activa.^{29, 47}

Por último en la tabla 04 se muestra el resultado de la clasificación embrionaria según su calidad después de siete días de cultivo en medio KSOMaa y SOFaa, las cuatro categorías de calidad se establecieron de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Para el medio de cultivo KSOMaa se halló 0% de embriones de excelente calidad, 6,32% de regular calidad y 6,84% de mala calidad con respecto al segundo medio SOFaa que se halló solo 3,03% de embriones de excelente calidad, 8,69% de regular calidad y de 6,62% de mala calidad, estas tres primeras categorías de calidad según la IETS lo constituyen los embriones transferibles. La población de embriones de categoría cuatro o intransferibles, para ambos medios de cultivo fue superior, 86,84% para KSOMaa y un 81,66% para SOFaa, este grupo está conformado por embriones degenerados, con desarrollo retardado y embriones de una célula: no viables.³²

La calidad y el desarrollo embrionario ejercen una marcada influencia sobre los resultados de la transferencia de embriones.^{6, 31-32, 48}

Como lo mencionado por Hasler J y Shebel R *et al*, quienes concluyen que la calidad de los embriones ejercen un factor significativo en la tasa de preñez para embriones transferidos en fresco y congelados-descongelados.^{17, 18}

185681

Por lo tanto la competencia para el desarrollo de los ovocitos y las condiciones subóptimas de cultivo, ambas se combinan para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad.⁹

VI. CONCLUSIONES

1. El porcentaje de ovocitos madurados *in vitro* fue similar para ambos protocolos de producción *in vitro* de embriones bovinos.
2. El porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación fue similar para ambos protocolos de producción *in vitro* de embriones bovinos.
3. El porcentaje de embriones producidos *in vitro* a los siete días de cultivo con medio SOFaa fue mejor con respecto al medio KSOMaa
4. Se clasificó a los embriones bovinos según su calidad de acuerdo a las normas de la IETS.

VII. RECOMENDACIONES

- 1. Medir la osmolaridad para evitar errores de pesado y dilución como también para controlar la calidad del agua empleada.**
- 2. No utilizar agua miliQ o agua de transferencia almacenada por más de dos semanas para la preparación de los diferentes medios ya que su calidad tiene un profundo efecto sobre el desarrollo de los embriones en cultivo.**

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estación experimental agropecuaria INTA. Manual para la producción *in vitro* y criopreservación de embriones bovinos. Balcarce-Argentina: Grupo de biotecnología de la reproducción; 2006.
2. 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=S0798225920100003000007
3. 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 23 de abril de 2013); 15(01). Disponible en:
http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2015%20Supl/p_herradon.pdf
4. 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 setiembre de 2013); 38(02). Disponible en:
http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0301-732X20060002000002&script=sci_arttext
5. Rafagnin L, Fernandez da Silva K, Gomes dos Santos G, Fortes J, Seneda M. Producción *in vitro* de embriones de razas lecheras a gran escala. Rev Spermova. 2011; 01 (01):86-91.
6. Palma, G. Biotecnología de la reproducción. Argentina: Edit. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2001.
7. Ramón J, Deneb P. Contribución de la biotecnología reproductiva a la biodiversidad (página principal en internet) Yucatán- México: cicy.mx (acceso 20 de julio de 2013). Disponible en:
<http://www.cicy.mx/Documentos/CICLOVIVOS/Biodiversidad/pdfs/Cap9/09%20Contribucion%20de%20la%20biotecnologia.pdf>
8. Landinez J, Hernández-Fonseca H. Historia y evolución de las biotecnologías aplicadas a la reproducción (página principal en internet). Venezuela; 2008 (acceso 08 de diciembre de 2013). Disponible en:
http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_57.pdf.

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 julio de 2013); 61(2). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803560>
10. Fernández A, Díaz T, Muñoz G. Producción *in vitro* de embriones bovinos. Rev. Facultad de Ciencias Veterinarias (revista en internet); 2007 (consultado 02 de marzo de 2013)48 (01). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0258-65762007000100006&script=sci_arttext
11. 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 14 de agosto de 2013); 27 (03). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-72692009000300007&script=sci_arttext
12. Mejía V, Arango S, Pareja A, Camargo O, Urrego R. Evaluación de dos protocolos de cultivo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. Revista CES. Medicina veterinaria y zootecnia (revista en internet) julio-diciembre 2009 (consultado 19 de noviembre de 2013); 4(02). Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428102004.pdf>
13. Wrenzycki C, Hermann D, Keskinetepe I, Martins A, Sirisathien S, Brackertt B, Niemann H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Human reproduction and Embryology* (revista en internet) 2001 (acceso 29 mayo del 2014). Vol. 16. Page 893-901. Disponibles en: <http://www.theriojournal.com>
14. Nedambale T, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky J, Tian X, Yang, X. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology journal* (revista en internet) 2004 (consultado 27 de octubre de 2013); Vol 62. Disponible en: <http://www.theriojournal.com/>
15. Quintanilla Mejía, Lisbeth G. Efecto de la suplementación del medio de maduración con cisteína y dos medios de cultivo (KSOM aa y SOF) en la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos (tesis de pregrado) Lima: Universidad Mayor de San Marco; 2012.

16. Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N, Parrish J, Memili E. Developmental and molecular correlates of bovine pre implantation embryos. *Reproduction the journal of the society for reproduction and fertility* (revista en internet) 2006 (acceso 29 de enero de 2014) 131 (5) 895-904. Disponible en: <http://www.reproduction-online.org/content/131/5/895.full.pdf>
17. Hasler, J. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* (revista en internet) 2001 (consultado 05 de junio de 2013); Vol 56. Page 1401-1415. Disponible en: <http://www.theriojournal.com/>
18. Shebel R, Demetrio D, Metzger J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* (revista en internet) 2008 (acceso 3 de abril del 2014) Vol 69. Page 98-106. Disponibles en: <http://www.theriojournal.com>
19. Parrish, J. Fertilización *in vitro* en bovinos: maduración *in vitro* de ovocitos y capacitación espermática con heparina. *Theriogenology an International Journal of Animal Reproduction* (revista en internet) 2013 (acceso 06 de enero del 2014) Vol 8. Pag (67-73). Disponible en: <http://www.theriojournal.com>
20. Rivas E, Veli E, Aquino Y, Rivas V, Pastor S, Estrada R. Acción para la caracterización y conservación del bovino criollo peruano (*Bos taurus*). *AGRI Animal Genetic Resources Information*, N° 40 (33-42). 2007.
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 junio de 2013). 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. Hafez, E. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ªed. España. Edit. MC Graw Hill; 2002.
24. García, E. Análisis de diferentes factores que afectan al rendimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en la especie porcina

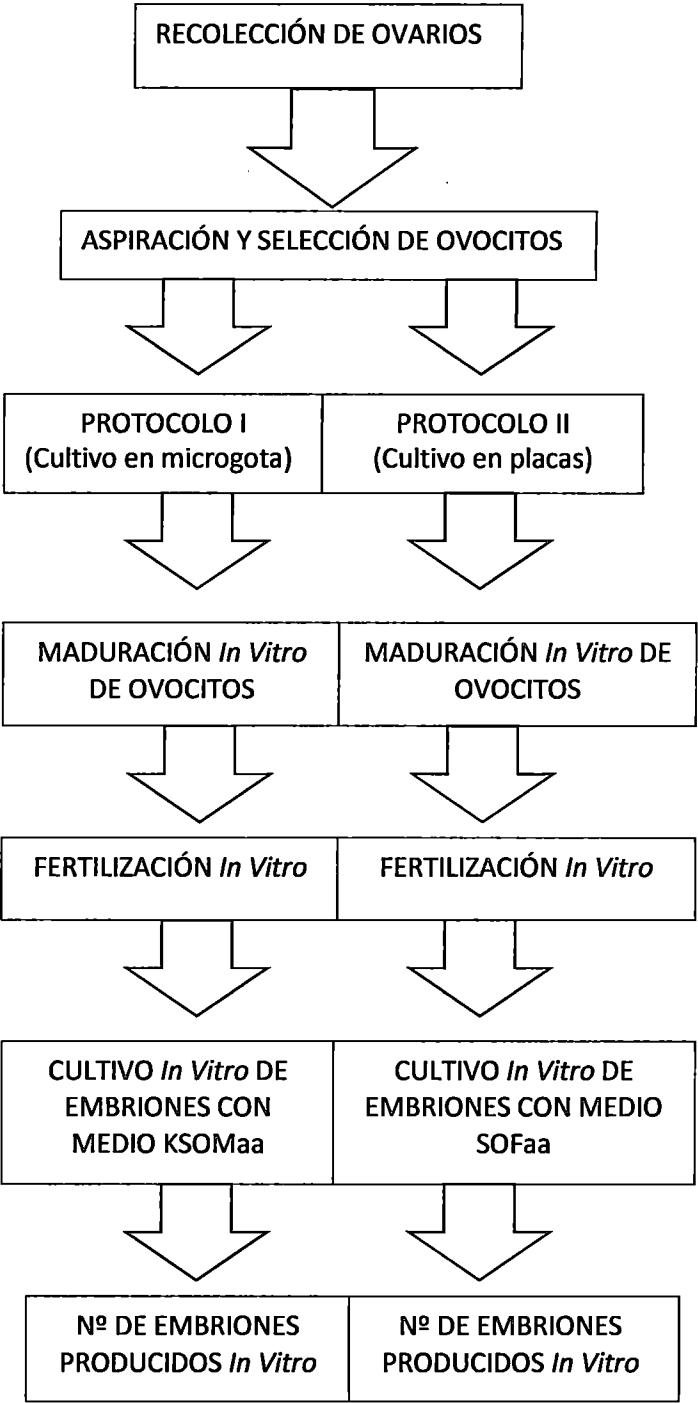
- (Revisión bibliográfica) 2005 (acceso 02 de febrero de 2013). Disponible en: http://www.tesisenxarxa.net/TDX/TDR_UM/TESIS/...//egr02de1
25. Lattanzi, M. Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinós (Tesis doctoral). Buenos Aires Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires; 2010. Disponible en: http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4682_Lattanzi.pdf
 26. Hendriksen P, Vos P, Steenweg W, Bevers M, Dieleman S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology* (revista en internet) 2000 (consultado 10 de enero de 2014); Vol 53. Page 11-20. Disponible en: <http://www.theriojournal.com/>
 27. Khurana N, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* (revista en internet) 2000 (consultado 07 de mayo de 2013); Vol 54. Pages 741-756. Disponible en: <http://www.theriojournal.com/>
 28. Bonilla-Musoles, Dolz, Moreno, Raga. Reproducción asistida: abordaje en la práctica clínica. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 2009.
 29. Sirard, M A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* (revista en internet) 2001 (acceso 06 de febrero del 2014). Vol 55. Page 124-1254. Disponibles en: <http://www.theriojournal.com>
 30. Seidel G, Moore S. Training manual for embryo transfer in cattle (página principal en internet). Estados Unidos: FAO Corporate Document Repository; (acceso 09 de octubre de 2013). Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/004/T0117E/T0117E00.HTM>
 31. Galina C, Valencia J. Reproducción de animales domésticos. 3ª ed. México: Limusa, S.A; 2011.
 32. Stringfellow D, Givens M. Manual of the International Embryo Transfer Society. 4 th Edition. Champaign, Illinois USA. Page 87-90 and 141-144, 2013.
 33. Palasz A T, 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 parte (II) (página principal en internet). Madrid: es.scribd.com; 2000 (acceso 28 de agosto del 2013). Disponible en: <http://scribd.com/doc/6137003/9-Cultivo-de-Embriones-Bovinos>.

34. Salgado R, Vergara O, Ramírez L. Efecto de gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de oocitos bovinos cultivados *in vitro*. Rev. MVZ Cordova (revista en internet) 2010 (acceso 1 de abril del 2014) Vol 15. Disponibles en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-151/v15n1a8.pdf>
35. Rivas R, Fimbres M. Manual de prácticas de biotecnología de la reproducción (manual on line) 2011 (acceso 25 de agosto de 2013). Disponible en: <http://sirio.uacj.mx/ICB/cqb/licenciaturaenbiolog%C3%ADa/Documents/Manuales/optativas/BIOLOGIA%20DE%20LA%20REPRODUCCION.pdf>
36. Peláez, V. Producción *in vitro* de embriones bovinos (tesis de pregrado) Ecuador: Universidad de Cuenca; 2011.
37. Salgado R, Rugeles C, Alvarez J. Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*. Rev. Colombiana de ciencias pecuarias (revista en internet) julio-setiembre 2005 (consultado 03 de setiembre de 2013); 18(02). Disponibles en: <http://www.redalyc.org/pdf/2950/295022959003.pdf>
38. Gardón J, Matás C, Gadea J. Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica. Anales de veterinaria de Murcia (revista en internet) 2001 (consultado 21 de setiembre de 2013); 17(01). Disponible en: <http://revistas.um.es/analesvet/article/viewFile/16541/15951>.
39. Pinyopummintr T, Bavister B. *In vitro*-matured/ *in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of reproduction* (revista en internet) 1991 (acceso 06 de enero del 2014); Vol 45. Pag 736-742. Disponible en: <http://www.biolreprod.org/content/45/5/736.full.pdf>
40. Urbina M, Lerner J. Fertilidad y reproducción asistida editorial Medica Panamericana. Caracas: Editorial Medica Panamericana; 2008.
41. Sinervia. Compendium de reproducción animal. 9^{na} edición. Montevideo-Paraguay: Editorial Intervet; 2007.
42. Quintela L, Díaz C, García P, Peña A, Becerra, J. Ecografía y reproducción en la vaca. España: Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico; 2006.

43. Rippe, C. Ciclo estral. (página principal en internet):The dairy Cattlere production conference; 2009 (acceso 17 de julio de 2013). Disponible en:<http://www.dccouncil.org/media/Public/Rippe%20DCRCH%202009.pdf>
44. Scott, F. Biología del desarrollo. 7ª Ed España: Edit Médica Panamericana S.A; 2005.
45. Gasque, R. Enciclopedia bovina. México. Edit. El comité de la FMVZ, UNAM; 2008.
46. Choi Y, Carnevale E, Seidel G, Squires E. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* (revista en internet) 2000 (acceso 08 de marzo del 2014).Vol 56. Page 661-670. Disponibles en: <http://www.theriojournal.com>
47. Sirard M, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribucion of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* (revista en internet) 2006 (acceso 29 de diciembre del 2013). Vol. 65. Page 126-136. Disponibles en: <http://www.theriojournal.com>
48. Oyuela L, Jiménez C. Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones .Rev. Med. Vet. Zoot (revista en internet) 2010 (consultado 02 de diciembre de 2013); Vol 57. Pag 191-200. Disponible en: <http://www.docentes.unal.edu.co/cjimeneze/docs/8189.pdf>
49. Filipiak Y, Larocca C. biotecnología en reproducción bovina: manual teórico práctico. Montevideo-Uruguay: Universidad de la Republica, departamento de Reproducción animal; 2012.
50. Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinamica ovarica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. In Vet. (revista en internet) 2006 (acceso 12 de enero del 2013). Vol. 8(01). Disponibles en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982006000100018&script=sci_arttext.
51. Motta P, Ramos N, González C, Castro E. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. Rev. Vet. Zootec (revista en internet) 2011 (consultado 05 de marzo de 2013); Vol 5.Pag 88-99. Disponible en: [http://200.21.104.25/vetzootec/downloads/MVZ5\(2\)_8.pdf](http://200.21.104.25/vetzootec/downloads/MVZ5(2)_8.pdf)

ANEXOS

Anexo 01. Flujograma de la producción *in vitro* de embriones bovinos



Anexo 02. Tabla de la clasificación del Complejo *Cúmulus* Ovocito

CLASIFICACIÓN DEL COMPLEJO <i>CÚMULUS</i> OVOCITO		
CLASIFICACIÓN	CALIDAD	CARACTERÍSTICAS
A	Bueno	Completamente rodeado por más de tres capas de células del <i>cúmulus</i> y citoplasma homogéneo (granulado fino y uniforme, sin mostrar espacio previtelino ni vacuolizado)
B	Regular	Rodeado parcialmente por tres capas de células del <i>cúmulus</i> y con citoplasma irregular.
C	Malo	Desnudo
D	Degenerado	Rodeado por fibrina (con aspecto de tela de araña)

Fuente Filipiak Y, Larocca C.⁴⁹

**Anexo 03. Tabla de clasificación embrionaria según la Sociedad
Internacional de Transferencia de Embriones**

CÓDIGO	NOMBRE	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA
I	Excelente o bueno	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. 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.
II	Regular	Embriones con moderadas irregularidades en la masa embrionaria con poca presencia de blastómeros desprendidos o blastómeros con irregularidades en tamaño, color y densidad. Al menos 50% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta viable.
III	Malo	Embrión con mayores irregularidades en la masa embrionaria con presencia de blastómeros desprendidos o blastómeros como forma irregular o de color muy oscuro o muy claro y/o ligero agrietamiento de la zona pelúcida. Al menos 25% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta viable.
IV	Muerto o degenerado	Embriones degenerados o aquellos con desarrollo retardado con respecto a los demás embriones además de embriones de una célula: inviiables. Esta categoría es considerada como no transferible.

Fuente Stringfellow D, Givens M.³²

Anexo 04. Método de separación espermática *Swim up*

- Se descongeló semen a 37°C por un minuto, luego se colocó en tubos de centrifuga, 2ml de semen con 2ml de medio del cultivo Sp-Talp
- Se centrifugó dos veces a 1800 rpm por 5 minutos, paralelamente en un tubo Eppendorf se colocó un 1 ml de medio Fert-Talp y se llevó a la incubadora de CO₂.
- Finalizada la última centrifugación se descartó el sobrenadante y al pellet se le agregó 100ul de medio Fert-Talp y se homogenizó, luego con una micropipeta se tomó todo el pellet diluido y lentamente se le agregó al fondo del tubo Eppendorf que contenía 1ml de medio Fert-Talp, sin que se produzca la disociación del pellet.
- Se colocó finalmente en la incubadora de CO₂ a 38°C con una inclinación del tubo a 45° y se dejó migrar los espermatozoides por 30 a 45 minutos. Se recuperó de 200 a 500 ul de espermatozoides de mejor calidad en el sobrenadante.
- La fertilización se realizó utilizando una concentración espermática de 1 a 2×10^6 espermatozoides/ml. La determinación de la concentración espermática se realizó en la cámara de Neubauer.

Anexo 05. Preparación de solución salina fisiológica

SOLUCIÓN SALINA 0.9% para 1 litro

NaCl	9 g
Agua destilada	1000 ml
Gentamicina	1 ml

Anexo 06. Protocolo I Medio de cultivo KSOMaa

MEDIO DE LAVADO (PREMADURACIÓN)

Componentes	Concentration final	Volume/10ml
SOF-Hepes Solución		10 ml
L-glutamina-stock		100 µl
Piruvato stock		30 µl
Gentamicina	50 µg/ml	10 µl (stock)
Aminoácidos esenciales	50x	200 µl
Aminoácidos esenciales no	100x	100 µl
PVP-40		40 mg

Filtrar con filtro de jeringa de 0,02µm y mantener congelado por un periodo máximo de 2 semanas, preincubar el medio con dos horas de anticipación a 38,5°C, 5%CO₂ y 95%HR antes de su utilización.

MEDIO DE MADURACIÓN

Componentes	Concentration final	Volume/10ml
TCM-199		9 ml
FCS	10%	1 ml
FSH-LH stock	0,02 unid/ml	10 µl (stock)
Piruvato	0,2 mM	20 µl (stock)
Gentamicina	50 ug/ml	10 µl (stock)

- Filtrar con un filtro de jeringa de 0,02µm y mantener congelado por un periodo máximo de 2 semanas, antes de su uso agregar FSH-LH stock, cubrirlo con aceite mineral y pre incubarlas con dos horas de anticipación a 38,5°C, 5%CO₂ y 95%HR.

- Piruvato stock: 11mg/ml

- FSH-LH stock: 0,1mg/FSH y 0,5 mg/LH 1000ul de suero fis.

MEDIO DE FERTILIZACIÓN

Componentes	Concentration final	Volume/10ml
TL-Stock		10 ml
BSA	6 mg/ml	0,06 g
Piruvato	0,2 mM	20 µl
Gentamicina	50 µg/ml	10 µl (stock)

- Filtrar con un filtro de jeringa de 0,02µm y mantener congelado por un periodo máximo de 2 semanas, antes de su uso agregar 2ul de solución de heparina stock (1mg/ml), cubrirlo con aceite mineral y pre incubarlas con dos horas de anticipación a 38,5°C, 5%CO₂ y 95%HR.

- Piruvato stock: 11mg/ml

TL-STOCK

Componentes	Concentration final (mM)
NaCl	114
KCl	3,2
NaHCO ₃	25
NaH ₂ PO ₄	0,34
Lactato de Na	10
CaCl ₂ Stock	2
MgCl ₂ Stock	5
Rojó fenol	1mg/100ml

Ajustar el ph a 7,4 .Filtrar y almacenar por un periodo máximo de 2 semanas a 4°C.

Anexo 07. Protocolo II Medio de cultivo SOFaa

MEDIO DE MANIPULACIÓN

Ingredientes	Concentration final	Volume/100ml
TCM-HEPES		90 ml
SFB	10%	10 ml
Gentamicina	50 µg/ml	100 µl (stock)
- Gentamicina stock: sulfato de gentamicina 50mg/ml de suero fisiológico		

MEDIO DE MADURACIÓN

Ingredientes	Concentration final	Volume/10ml
TCM-199		9 ml
L-Glutamina	0,6 mM	60 µl (stock)
Piruvato	0,2 mM	20 µl (stock)
FSH	0,01 U/ml	50 µl (stock)
LH	0,01 U/ml	50 µl (stock)
SFB	10%	1ml
Gentamicina	50 µg/ml	10 µl (stock)
17-β estradiol	1 µg/ml	10 µl (stock)
- L-glutamina stock: 14,6 mg/ml		
- Piruvato stock: 11 mg/ml		
- FSH y LH stock: 0,5 mg/ml de FSH/LH		
- 17-β estradiol: 1 mg/ml de etanol absoluto		

MEDIO DE FERTILIZACIÓN

Ingredientes	Concentration final	Volume/10ml
TALP-FIV		10 ml
Piruvato	2 mM	100 µl (stock)
Heparina	0,03 mg/ml	100 µl (stock)
Gentamicina	50 µg/ml	10 µl (stock)
BSA-FAF	6 mg/ml	60 mg
- Piruvato stock: 25 mg/ml		
- Heparina stock: 3 mg/ml		
- Gentamicina stock: sulfato de gentamicina 50mg/ml de suero fisiológico		

TALP – FIV

Componentes	Concentración final (mM)
NaCl	114,0
KCl	3,2
CaCl ₂ +2H ₂ O	2,0
MgCl ₂ +6H ₂ O	0,5
NaHCO ₃	25,0
NaH ₂ PO ₄	0,3
Lactato de Na (60%)	10,0
Rojo fenol	1mg/100ml
Ajustar el pH a 7,4 con 1N de NaOH.	

Anexo 08. Composición del medio KSOMaa y SOFaa

Componentes	KSOMaa	SOFaa
Sales inorgánicas (mM)		
NaCl	95	100
KCl	2,5	7
KH ₂ PO ₄	0,35	1,2
CaCl ₂ +2H ₂ O	1,71	1,71
MgCl ₂ +6H ₂ O	-	0,49
NaHCO ₃	25,07	25,07
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,20	-
Rojo fenol	1 mg/100ml	1 mg/100ml
Otros componentes		
Lactato de sodio (60%, mM)	21,9	3,3
Piruvato de sodio (mM)	0,6	0,4
Glutamina (mg/ml)	1,46	0,039
Aminoácidos esenciales	50x	50x
Aminoácidos no esenciales	100x	100x
Ácido cítrico (mg/ml)	-	0,1
Myoinositol (mg/ml)	-	0,5
SFB	-	2%
BSA (mg/ml)	3	3
Glucosa (mM)	0,2	-
EDTA (mg/ml)	3	-
Gentamicina (ug/ml)	50	50

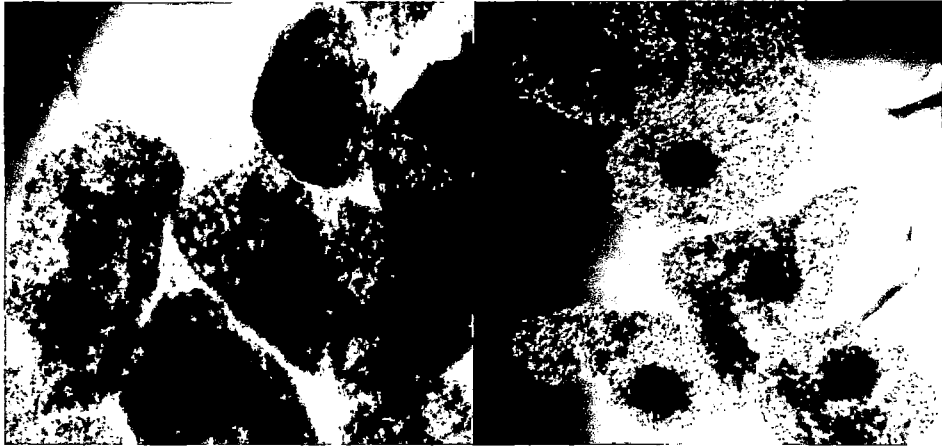
Anexo 09. Composición del Medio 199

	Componentes	g/L
1	Calcium choride	0,2
2	Ferric Nitrate.9H ₂ O	0,00072
3	Magnesium Sulfate	0,09767
4	Potassium Chloride	0,4
5	Sodium Acetate	0,05
6	Sodium Chloride	6,8
7	Sodium Phosphate Monobasic	0,122
8	L-alanine	0,025
9	L-arginine.HCl	0,07
10	L-aspartic Acid	0,03
11	L-cysteine.HCl.H ₂ O	0,00011
12	L-cystine. 2HCl	0,026
13	L-glutamic acid	0,0668
14	L- glutamine	0,1
15	Glycina	0,05
16	L- histidine. HCl.H ₂ O	0,02188
17	Hydroxy-l-proline	0,01
18	L-isoleucine	0,02
19	L-leucine	0,06
20	L-lysine-HCL	0,07
21	L-methionine	0,015
22	L-phenylalanine	0,025
23	L-proline	0,04
24	L-serine	0,025
25	L-threonine	0,03
26	L-tryptophan	0,01
27	L-tyrosine 2Na.2H ₂ O	0,05766
28	L-Valine	0,025
29	L-ascorbic acid.Na	0,00005666
30	D-biotin	0,00001
31	ergocalciferol	0,0001
32	Choline chloride	0,0005
33	Folic acid	0,00001
34	Menadione (sodium bisulfite)	0,000016
35	Myo-inositol	0,00005
36	Niacinamide	0,000025
37	Nicotinic acid	0.000025
38	p-aminobenzoic acid	0,00005
39	D- pantothenic acid	0,00001
40	Pyridoxal.HCL	0,000025
41	Pyridoxine.HCL	0.000025
42	Retinol acetate	0,00014
43	Riboflavin	0,00001
44	(+,-)-a-Tocopherol phosphate.2Na	0,00001

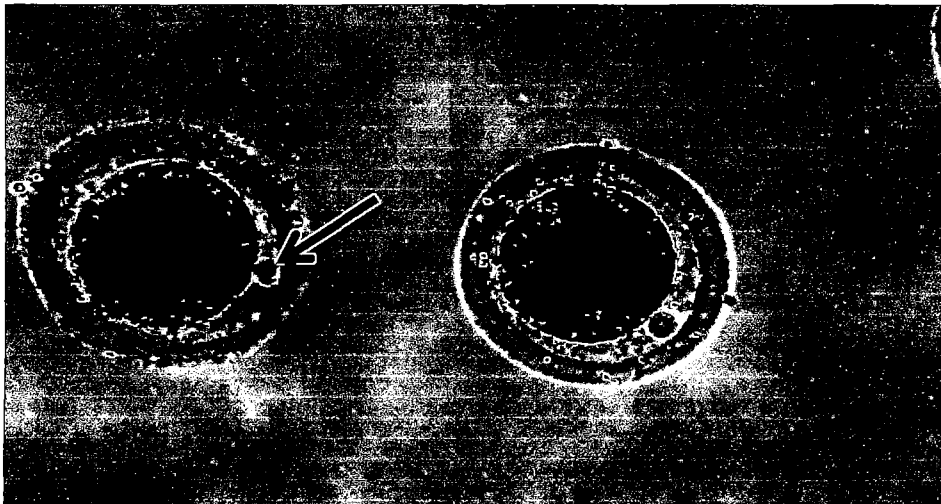
45	Thiamine.HCl	0,00001
46	Adenine hemisulfate	0.01
47	Adenine 5'-triphosphate.2Na	0.001
48	Adenine 5'-monophosphate.Na	0,0002385
49	Cholesterol	0,0002
50	2-Deoxy-ribose	0,0005
51	Glucose	1,0
52	Glutathione (reduced)	0,00005
53	Guanine.HCl	0,0003
54	Hypoxanthine	0,0003
55	Phenol red.Na	0,0213
56	Polyoxyethylenesorbitan monooleate	0,02
57	Ribose	0,0005
58	Thymine	0,0003
59	Uracil	0,0003
60	Xanthine.Na	0,000344

Fuente Estación experimental agropecuaria INTA. ¹

Anexo 10. Características morfológicas de la maduración *in vitro*



Ovocitos con presencia de células del cúmulus bien expandidas



Ovocito en metafase II y la presencia de su primer cuerpo polar

Anexo 11. Clasificación del Complejo *Cúmulus* Ovocito



Ovocito de calidad A



Ovocito de calidad A



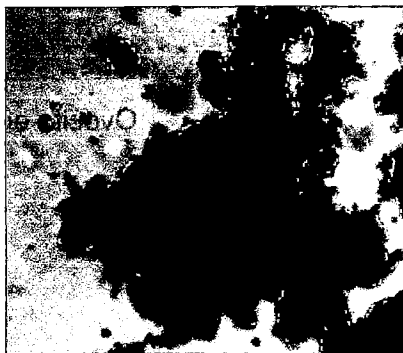
Ovocito de calidad B



Ovocito de calidad C

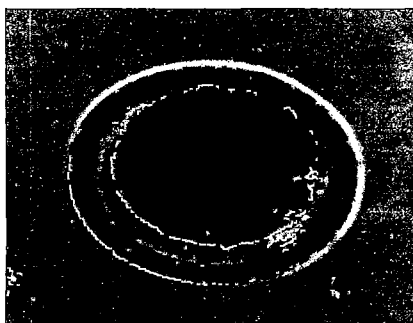


Ovocito de calidad C

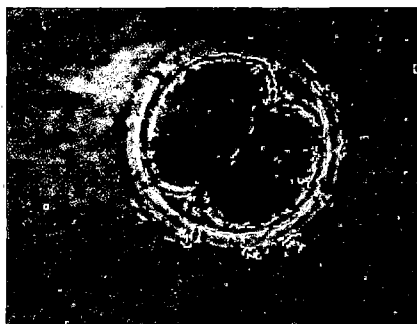


Ovocito de calidad D

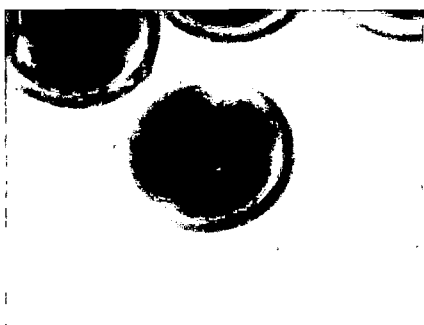
Anexo 12. Desarrollo *in vitro* de embriones bovinos



CIGOTO



EMBRIÓN DE DOS CÉLULA



**EMBRIÓN DE CUATRO
CÉLULA**



MÓRULA



MÓRULA COMPACTA



BLASTOCISTOS TEMPRANO

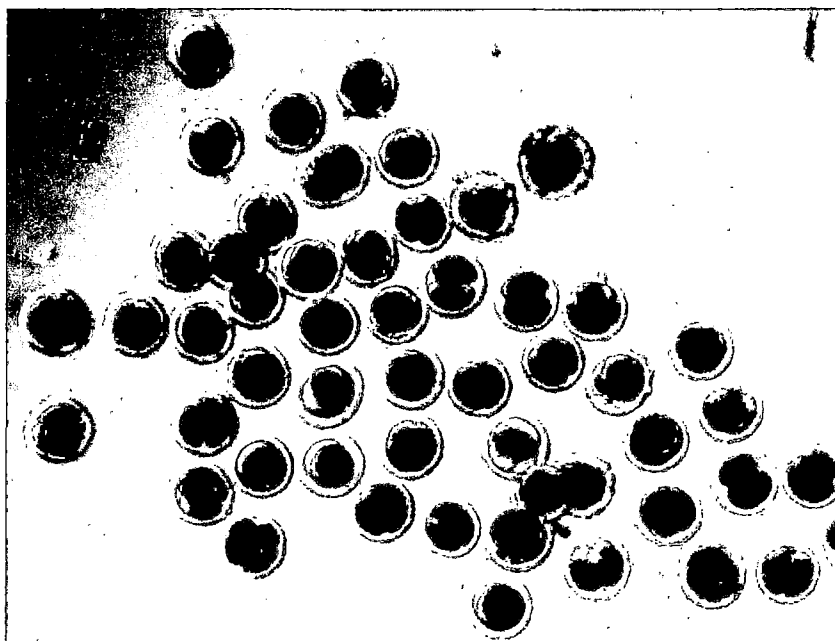


BLASTOCISTOS

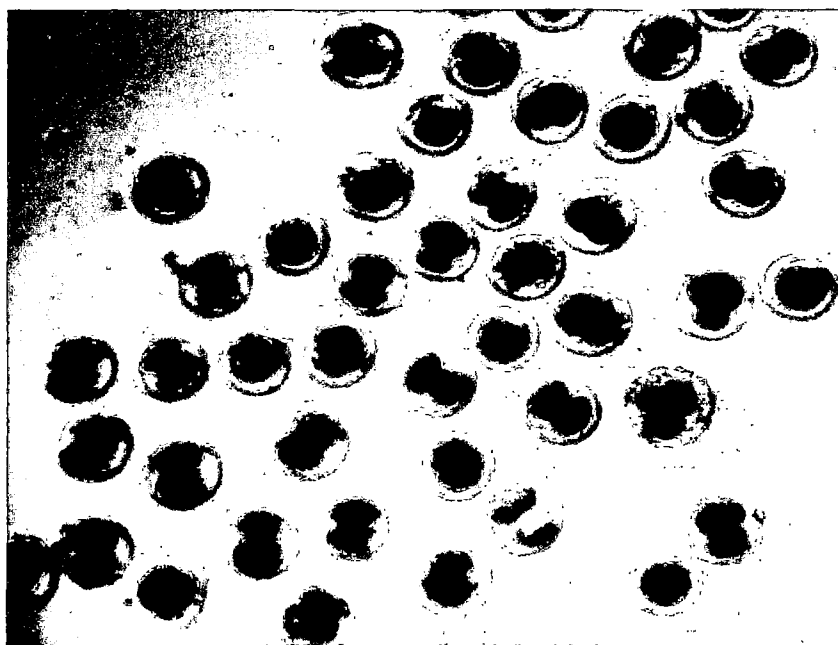


**BLASTOCISTOS
EXPANDIDO**

Anexo 13. Embriones en división a las 48 horas post inseminación

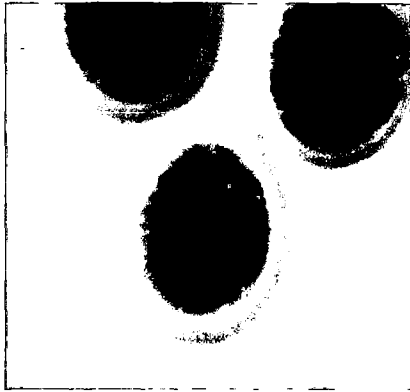


Medio de cultivo KSOMaa



Medio de cultivo SOFaa

Anexo 14. Evaluación de la calidad embrionaria según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones



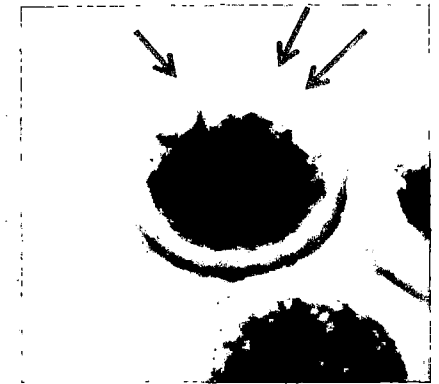
Calidad 1:
Mórula con presencia de
blastómeros compactados



Calidad 1:
Mórula con presencia de
blastómeros compactados



Calidad 1:
Mórula con presencia de
blastómeros compactados



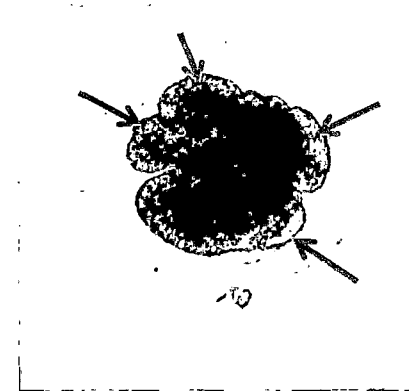
Calidad 1:
Mórula con presencia de
blastómeros extruidos



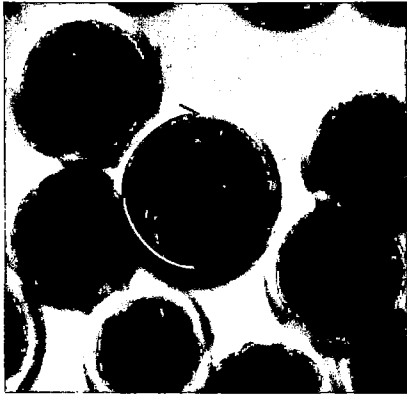
Calidad 2:
Mórula con presencia de
blastómeros extruidos



Calidad 2:
Mórula con presencia de
blastómeros extruidos



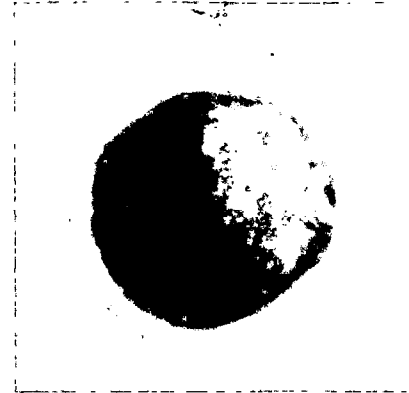
Calidad 3:
Mórula con presencia de
blastómeros extruidos y de
diferentes tamaños



Calidad 1:
Blastocisto con masa celular
intacta y consistente con la
etapa de desarrollo esperado



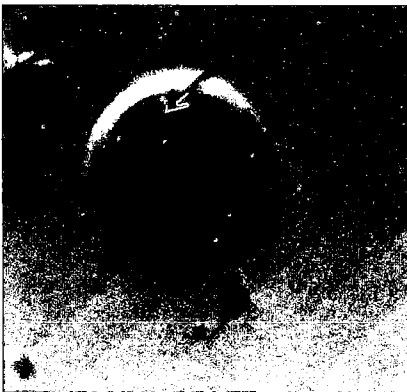
Calidad 1:
Blastocisto con masa celular
intacta y consistente con la
etapa de desarrollo esperado



Calidad 1:
Blastocisto con masa celular
intacta y consistente con la
etapa de desarrollo esperado



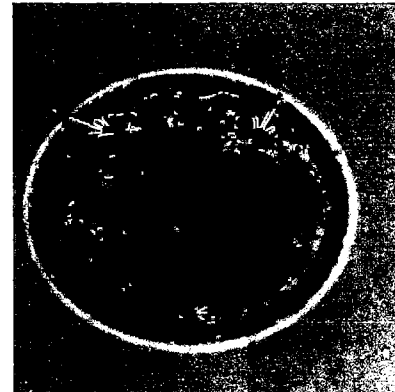
Calidad 1:
Blastocisto con la masa celular
intacta y formación inicial del
blastocelo



Calidad 2:
Blastocisto con la masa celular
intacta y formación inicial del
blastocelo



Calidad 2:
Blastocisto con presencia de
blastómeros extruidos



Calidad 2:
Blastocisto con presencia de
blastómeros extruidos



Calidad 2:
Blastocisto con presencia de
blastómeros extruidos



Calidad 2:
Blastocisto con presencia de
blastómeros extruidos



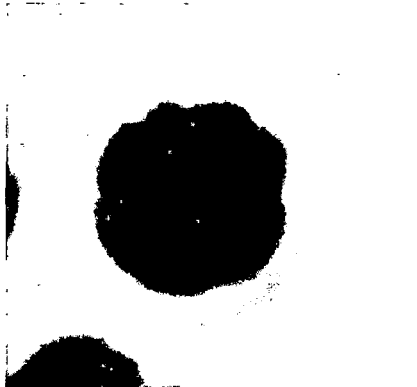
Calidad 3:
Blastocisto temprano con
formación inicial del blastocele y
blastómeros extruidos



Calidad 4:
Blastocisto con zona
pelúcida elongada



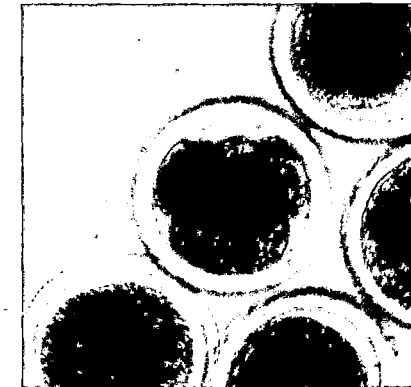
Calidad 3:
Blastocisto con zona
pelúcida elongada



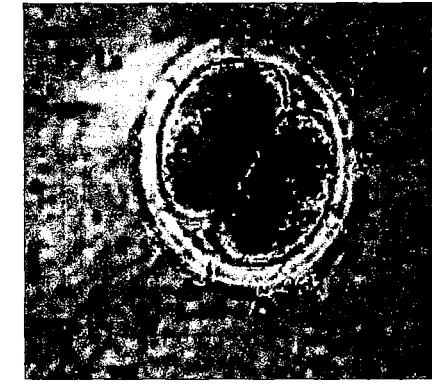
Calidad 4:
Mórula temprana
(Embrión con desarrollo
retrasado)



Calidad 4:
Embrión de 8 células
(Con desarrollo retrasado)



Calidad 4:
Embriones de 4 células
(Con desarrollo retrasado)



Calidad 4:
Embriones de 2 células
(Con desarrollo retrasado)

Anexo 15. Registro de la producción *in vitro* de embriones bovinos

PROTOCOLO	AÑO	N°	FECHA	N° DE OVARIOS	OVOCITOS			CANT. DE MADURADOS	%	CANT. DE FERTILIZADOS	CANT. DE CULTIVADOS	CANT. DE SEGMENTADOS A LAS 48 HORAS POST INSEMINACION	% DE SEGMENTADOS A LAS 48 HORAS POST INSEMINACION	N° TOTAL BLASTOCISTOS	% DE BLASTOCISTOS	N° TOTAL DE MORULAS	% DE MORULAS	N° TOTAL DE MORULAS Y BLASTOCISTOS	% DE MORULAS Y BLASTOCISTOS	CALIDAD			
					CALIDAD															C1 (Excelent e-Buena)	C2 (Regular)	C3 (Mala)	C4 (Muerto o degenerado)
					C-1/C-2	C-3	T. DE OVOCITOS																
SOF	2012	1	28/05/2012	24	50	70	120	50	100,00	38	38	10	26,32	8	21,05	0	0,00	8	21,05	4	4	0	30
		2	03/06/2012	50	124	197	321	121	97,58	95	87	51	58,62	15	17,24	0	0,00	15	17,24	1	6	8	72
		3	03/07/2012	30	100	85	185	94	94,00	90	83	39	46,99	6	7,23	0	0,00	6	7,23	2	2	2	77
		4	03/07/2012	25	52	97	149	47	90,38	28	28	17	60,71	12	42,86	0	0,00	12	42,86	1	7	4	16
		5	09/07/2012	28	100	112	212	96	96,00	75	62	21	33,87	9	14,52	1	1,61	10	16,13	0	7	3	52
		6	10/07/2012	28	100	105	205	98	98,00	79	71	19	26,76	11	15,49	1	1,41	12	16,90	1	5	6	59
		7	11/07/2012	24	100	136	236	94	94,00	91	74	22	29,73	12	16,22	2	2,70	14	18,92	1	7	6	60
		8	22/07/2012	44	120	174	294	112	93,33	97	82	54	65,85	20	24,39	6	7,32	26	31,71	1	14	11	56
		9	16/08/2012	30	100	180	280	100	100,00	94	76	28	36,84	15	19,74	3	3,95	18	23,68	3	9	6	58
		10	21/08/2012	31	100	186	286	97	97,00	94	75	8	10,67	4	5,33	2	2,67	6	8,00	4	1	1	69
		11	09/09/2012	28	58	113	171	58	100,00	50	49	17	34,69	5	10,20	1	2,04	6	12,24	4	1	1	43
KSOM	2012	1	03/12/2012	36	48	165	213	45	93,75	30	30	16	53,33	5	16,67	0	0,00	5	16,67	0	3	2	25
		2	07/12/2012	32	62	98	160	57	91,94	54	54	10	18,52	6	11,11	0	0,00	6	11,11	0	6	0	48
		3	07/12/2012	32	50	124	174	50	100,00	47	47	12	25,53	7	14,89	0	0,00	7	14,89	0	0	7	40
		4	09/12/2012	32	39	120	159	32	82,05	25	25	4	16,00	2	8,00	1	4,00	3	12,00	0	3	0	22
		5	09/12/2012	32	65	86	151	58	89,23	53	53	16	30,19	7	13,21	0	0,00	7	13,21	0	5	2	46
		6	11/12/2012	28	84	121	205	77	91,67	75	75	17	22,67	11	14,67	0	0,00	11	14,67	0	5	6	64
		7	11/12/2012	26	96	84	180	92	95,83	88	88	29	32,95	7	7,95	4	4,55	11	12,50	0	4	7	77
		8	13/12/2012	30	112	170	282	106	94,64	98	98	59	60,20	12	12,24	0	0,00	12	12,24	0	6	6	86
		9	15/12/2012	32	85	126	211	85	100,00	73	73	30	41,10	8	10,96	2	2,74	10	13,70	0	4	6	63
	2013	10	24/09/2013	15	28	32	60	28	100,00	25	23	17	73,91	3	13,04	1	4,35	4	17,39	0	0	4	19
		11	24/09/2013	15	26	28	54	26	100,00	21	19	7	36,84	1	5,26	0	0,00	1	5,26	0	1	0	18

Anexo 16. Prueba de T Student para la producción *in vitro* de embriones bovinos con medio de cultivo KSOMaa y SOFaa

Estadísticas de grupo					
TRATAMIENTO		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Nº de ovocitos madurados	KSOM	11	59,636	27,1193	8,1768
	SOF	11	87,909	24,8010	7,4778
% de ovocitos madurados	KSOM	11	94,4645	5,66282	1,70740
	SOF	11	96,3900	3,17075	,95602
Nº de embriones en división a las 48 horas post inseminación	KSOM	11	19,727	15,2977	4,6124
	SOF	11	26,000	15,5371	4,6846
% de embriones en división a las 48 horas post inseminación	KSOM	11	37,39	18,343	5,531
	SOF	11	39,19	16,998	5,125
Nº de mórulas y blastocistos a los 7 días de cultivo	KSOM	11	7,000	3,6332	1,0954
	SOF	11	12,091	6,1066	1,8412
% de mórulas y blastocistos a los 7 días de cultivo	KSOM	11	13,0582	3,23892	,97657
	SOF	11	19,6327	10,36111	3,12399

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Nº de ovocitos madurados	Se asumen varianzas iguales	,153	,700	-2,552	20	,019	-28,2727	11,0805	-51,3862	-5,1593
	No se asumen varianzas iguales			-2,552	19,842	,019	-28,2727	11,0805	-51,3980	-5,1475
% de ovocitos madurados	Se asumen varianzas iguales	2,259	,148	-,984	20	,337	-1,92545	1,95683	-6,00734	2,15643
	No se asumen varianzas iguales			-,984	15,709	,340	-1,92545	1,95683	-6,08001	2,22910
Nº de embriones en division a las 48 horas post inseminacion	Se asumen varianzas iguales	,169	,685	-,954	20	,351	-6,2727	6,5742	-19,9862	7,4408
	No se asumen varianzas iguales			-,954	19,995	,351	-6,2727	6,5742	-19,9864	7,4410
% de embriones en division a las 48 horas post inseminacion	Se asumen varianzas iguales	,024	,878	-,239	20	,814	-1,801	7,540	-17,529	13,928
	No se asumen varianzas iguales			-,239	19,885	,814	-1,801	7,540	-17,535	13,933
Nº de morulas y blastocistos a los 7 dias de cultivo	Se asumen varianzas iguales	1,419	,247	-2,376	20	,028	-5,0909	2,1424	-9,5600	-,6218
	No se asumen varianzas iguales			-2,376	16,291	,030	-5,0909	2,1424	-9,6261	-,5557
% de morulas y blastocistos a los 7 dias de cultivo	Se asumen varianzas iguales	5,714	,027	-2,009	20	,058	-6,57455	3,27308	-13,40206	,25297
	No se asumen varianzas iguales			-2,009	11,936	,068	-6,57455	3,27308	-13,71021	,56112

Anexo 17. Glosario de abreviaturas

KSOMaa	Medio optimizado simple de potasio solución stock
SOFaa	Fluido oviductal sintético
CR1aa	Medio Charles Rosenkrans con aminoácidos
HTF	Fluido tubarico humano (siglas en ingles)
TCM-199	Medio de cultivo tisular 199 (siglas en ingles)
Hepes	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-ácidoetanol sulfónico
TALP/ FIV	Tyrodé's albumina- lactato-piruvato
TL	Tyrodé's lactato
FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
FCS/SFB	Suero fetal bovino (siglas en ingles)
BSA	Albumina sérica bovina (siglas en ingles)
EAA	Aminoácidos esenciales (siglas en ingles)
NEAA	Aminoácidos no esenciales (siglas en ingles)
AMPc	Adenosina monofosfato-3',5'-cíclico
ZP3	Zona pelúcida glicoproteína 3
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	<i>Polyvinyl alcohol</i> (siglas en ingles)
PVP-40	Polivinilpirrolidona

Anexo 18. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Evaluación de dos protocolos para la producción <i>in vitro</i> de embriones "bovinos" <i>Bos Taurus</i> en la región de Ayacucho, 2012-2013.	¿Existirá diferencia en la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos después de siete días de cultivo con medio KSOMaa para el primer protocolo y medio SOFaa para el segundo protocolo?	Objetivo general a. Evaluar dos protocolos para la producción <i>in vitro</i> de embriones "bovinos" <i>Bos taurus</i> en la región de Ayacucho. Objetivos específicos: b. Determinar el porcentaje de ovocitos madurados para ambos protocolos de producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos. c. Determinar el porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación para ambos protocolos de producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos. d. Establecer cuál de los dos protocolos para la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos nos permita obtener mayor porcentaje de embriones después de siete días de cultivo con medio KSOMaa para el primer protocolo y SOFaa para el segundo protocolo. e. Clasificar a los embriones bovinos producidos <i>in vitro</i> según su calidad de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.	2.1. Antecedentes 2.2. Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos 2.2.1. Importancia de la producción <i>in vitro</i> de embriones 2.2.2. Etapas de la producción <i>in vitro</i> de embriones 2.3. Medios para la producción <i>in vitro</i> de embriones 2.3.1. Medios para la maduración <i>in vitro</i> 2.3.2. Medios para la fertilización <i>in vitro</i> 2.3.3. Medios para el cultivo <i>in vitro</i> 2.3.4. Parametros biofísicos 2.4. Otras definiciones conceptuales 2.4.1. Bovinos 2.4.2. Ciclo estral 2.4.3. Foliculogénesis 2.4.4. Dinamica folicular	Si existe diferencias en la producción <i>in vitro</i> de embriones bovino usando el medio de cultivo KSOMaa y SOFaa sobre el número de embriones obtenidos al final de siete días de cultivo, siendo los aditivos presentes en los medios de cultivo los que determinan los requerimientos nutricionales más óptimos que requieren los cigotos para finalizar su desarrollo y siendo además importante la clasificación acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.	Variable independiente: - Protocolo para la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos Indicadores: - Protocolo I con medio de cultivo KSOMaa - Protocolo II con medio de cultivo SOFaa Variable dependiente: - Embriones bovinos Indicadores: - Número de embriones - Calidad embrionaria según la IETS	Tipo de investigación Básica experimental Población La población de estudio comprende los ovocitos colectados por aspiración folicular a partir de ovarios de vacas sacrificadas en el centro de beneficio Quicapata S.A. ubicado en el distrito de Carmen Alto de la ciudad de Ayacucho. Muestra Está constituida por los ovocitos de categoría A y B colectados por aspiración folicular a partir de los ovarios de las vacas sacrificadas en el centro de beneficio Quicapata S.A. Muestreo La clasificación de los ovocitos de categoría A y B se realizan de acuerdo a sus características morfológicas como número y compactación de las células del <i>cúmulus</i>. Instrumentos. - Cámara de flujo laminar - Incubadora de CO₂