











































Una vez terminado los 20 minutos de centrifugación, se extrajo el pellet con una pipeta Pasteur atemperada y se colocó en el tubo rotulado como medio de lavado de espermatozoides.

1. Se tomó únicamente el pellet porque el Percoll es tóxico para los espermatozoides. No debe perturbarse el medio.
2. Se colocó el tubo en un contenedor de la estufa y se llevó a centrifugación a 200 revoluciones por 10 minutos.
3. Se eliminó el excedente, sin perturbar el medio para dejar únicamente el pellet.
4. Si se mezcla el medio es recomendable centrifugar nuevamente. Este procedimiento se realizó rápidamente porque los espermatozoides comienzan a moverse del pellet.
5. Se tomó una muestra y se observó al microscopio la motilidad individual de los espermatozoides sin usar laminilla. Mientras tanto el semen se dejó en la estufa.

En lo posterior se sacaron las placas de fertilización de la incubadora de CO<sub>2</sub> y se colocaron sobre la platina calentadora.

1. Una vez efectuada la dilución (se utilizó medio de fecundación).
2. Se ajustó 250µL de la suspensión de espermatozoides en cada uno de los pozos de fecundación y se anotó la hora como referencia del inicio del cultivo el día siguiente.
3. Se tomaron las dosis de la mitad de la suspensión y se agregó 25µL de PHE que permanecía en la estufa.
4. Se llevó la placa a la incubadora en un periodo de 18 a 20 horas.

#### **Cultivo de embriones.**

1. Se preparó gotas de cultivo de 30µL, 3 gotas de lavado por una de cultivo. En total 4 columnas de 4 gotas para cajas de 7cm.
2. Se adicionó delicadamente 8mL de aceite mineral dentro de las cajas.
3. Se introdujo las cajas a la incubadora 2 gases durante toda la noche.
4. Por cada pozo de fecundación se ocupó 2 tubos de 1.4mL (eppendorf) de medio de lavado en el baño maría y dos cajas de Petri de 3cm, una vacía y una con 2mL de medio de lavado, todo sobre la placa térmica (39°C).

Una vez cumplidas las 18 horas de fecundación.

1. Se recuperó los embriones de la caja, se los introdujo en uno de los tubos que contienen medio de lavado y se agregó 100µL de hialuronidasa.
2. Se pasó el tubo que contiene los embriones al vortex durante 2 a 3 minutos, con el fin de eliminar las células del *cumulus* presentes alrededor de los embriones.
3. Se aspiró el contenido del tubo con una pipeta y se lo colocó en la caja de Petri vacía, posteriormente se agregó al tubo 2mL más de medio de lavado y se realizó un segundo pasaje por el vortex para recuperar el total de embriones.
4. Se lavó los embriones y se los ubicó en la segunda caja de Petri (3cm) que contiene medio de lavado.
5. Se contaron los embriones y se los pasó por grupos de 25 a 30 sobre la primera gota de lavado en las cajas de cultivo; es recomendable cambiar la punta de la pipeta cada vez para evitar pasar aceite a la caja de Petri que contiene los embriones.
6. Cuando todos los embriones estaban en la primera gota de lavado se los pasó por las dos gotas siguientes y finalmente se depositaron en la última gota (gota de cultivo).

7. Cuando todos los embriones estaban en la columna de gotas de cultivo se introdujo las cajas de cultivo en la incubadora a 2 gases (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) a 39°C

Se realizó el seguimiento del cultivo a día 3(5-8 células), 5 (mórulas), 6, 7, y 8 (blastocitos) y tasa de eclosión, mismos que son representados en la sección de resultados y discusiones.

Se determinaron las siguientes variables: porcentaje de maduración *in vitro*, porcentaje de fertilización *in vitro*, porcentaje de clivaje, porcentaje de apoptosis, porcentaje de embriones obtenidos (blastocistos) al séptimo día. Para el análisis de los datos se utilizaron procedimientos de estadística descriptiva, así como el soporte de hojas de Excel para la elaboración de cuadros y gráficos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Recolección de oocitos.

Utilizando la técnica de punción ovárica se punzaron 36 ovarios obteniendo 241 oocitos, de los cuales 90 (37.34%) oocitos se clasificaron como degenerados por no presentar un desarrollo adecuado de las Células del *Cumulus Oophorus* (CCO) encontrándose sin ellas (desnudos); 151 oocitos (62.66%) fueron viables dando como promedio 4.03 oocitos viables por ovario (Cuadro 11; Figura 1).

El porcentaje de oocitos viables extraídos obtenidos es similar a los alcanzados por Martínez Quintero y García Recillas (2013) quienes empleando el método de punción ovárica con jeringa obtuvieron 65.76% de oocitos viables y 34.23% de oocitos degenerados; al igual que el estudio de activación de ovocitos de alpaca vitrificados después de maduración *in vitro* realizado por Ruíz *et al.* (2011) quienes reportan un 69% de oocitos viables y 31% de oocitos degenerados. Sin embargo, el estudio realizado por González *et al.* (1992) en la comparación de dos métodos de recolección de ovocitos de ovarios (aspiración folicular y seccionamiento) muestran resultados de 40.3%, 48.3%, 10.9% oocitos clases A, B y C respectivamente por el método de aspiración folicular.

El promedio de oocitos viables por ovario es similar a los reportados por Martínez Quintero y García Recillas (2013) con un promedio de 4.2 oocitos viables por ovarios; a diferencia, de lo encontrado por Kumar (2014) quien reporta 3.35; de la misma manera Ruíz *et al.* (2011) obtuvieron 3.5 complejos ovocito- cumulus (COC's) por ovario.

Cuadro 11. Número de oocitos recuperados utilizando la técnica de punción ovárica.

Repetición	Número de ovarios punzados	Número de oocitos extraídos	Número de oocitos degenerados	Número de oocitos viables extraídos	Promedio de oocitos viables por ovario
1	20	176	67 (38.07%)	109 (61.93%)	5.45
2	16	65	23 (35.38%)	42 (64.62%)	2.6
Total	36	241	90 (37.34%)	151 (62.66%)	4.03

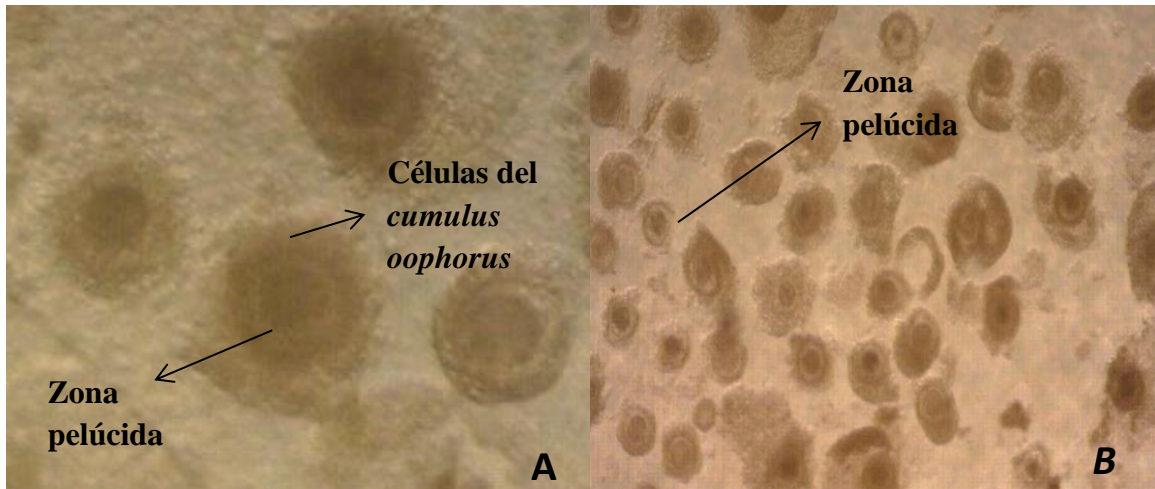


Figura 1. Oocitos obtenidos mediante punción ovárica con sus estructuras. A) Oocito viable B) Oocito degenerado.

#### **Porcentaje de maduración *in vitro*.**

Se colocaron a madurar 151 oocitos viables, de estos se seleccionaron 112 (74.17%) los que poseían un *Cumulus Oophorus* denso el cual cubría el total de oocito con un citoplasma uniformemente granulado y obscuro, mientras que 39 oocitos (25.83%) no maduraron (Cuadro 12; Figura 2).

El estudio realizado por Kumar (2014) quien suplementó el medio TCM 199 con las hormonas FSH y Gonadotropina arroja porcentajes superiores a los resultados de este estudio 76.66% con la hormona FSH y un porcentaje inferior 69.7% con la hormona Gonadotropina. Sin embargo, Ratto *et al.* (1999) obtuvieron un 93.7% de ovocitos madurados utilizando como medio de maduración TCM 199 suplementado con suero fetal bovino inactivado 10% (SFB2), hormona folículo estimulante (NIH-FSH-P1), estradiol, piruvato de sodio y sulfato de gentamicina.

Según el estudio de Landínez *et al.* (2010) en el que se evaluó el efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica, a las 23 horas de cultivo se obtuvo un 59.71% y a las 26 horas un 83% de ovocitos madurados, indicando que la proporción de ovocitos en metafase II aumenta significativamente con el incremento en el tiempo de cultivo, no así la tasa de degeneración.

Cuadro 12. Porcentaje de Maduración *in vitro* (MIV)

Repetición	Número de oocitos iniciales	Porcentaje de oocitos madurados	Porcentaje de oocitos no madurados
1	109	77.98% (85)	22.02% (24)
2	42	64.29% (27)	35.71% (15)
Total	151	74.17% (112)	25.83% (39)

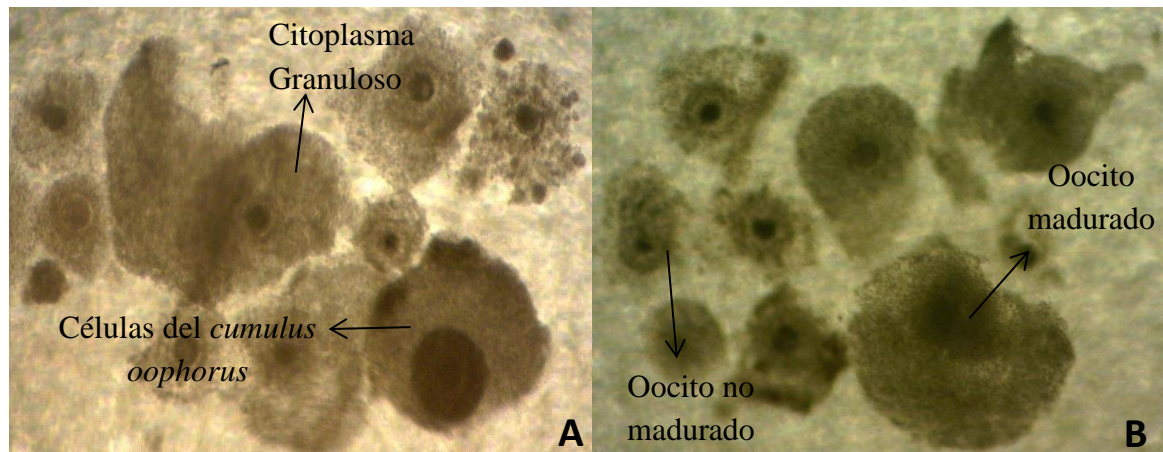


Figura 2. Oocitos obtenidos de maduración *in vitro*. A) Partes de un oocito madurado B) Oocito madurado y no madurado

### Porcentaje de oocitos fertilizados.

De los 112 oocitos madurados se obtuvo un porcentaje de fertilización de 78.57% (88 oocitos) y 21.43% (24 oocitos) oocitos no fecundados en medio de fecundación con Heparina porcina +PHE (Cuadro 13; Figura 3).

Martínez Quintero y García Redecilla (2013) trabajaron en la validación del protocolo de FIV (Universidad de Florida) usando el medio de fecundación IVF- TALP, obtuvieron una tasa de fertilización inferior a la de este estudio 43.53%, a diferencia de Cabrera *et al.* (2013) quienes utilizaron el medio IVF- TALP + PHE obteniendo tasas de fertilización de 56.8- 72.9%.

Salgado *et al.* (2005) en su estudio sobre el efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*, concluyen que la tasa de fertilización y la concentración espermática afectan la fertilización, encontrándose la mayor proporción de oocitos con fertilización normal 74% al utilizar concentración  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL.



Cuadro 13. Porcentaje de Fertilización *in vitro*.

Repetición	Número de oocitos iniciales	Porcentaje de oocitos fertilizados	Porcentaje de oocitos no fertilizados
1	85	77.65% (66)	22.35% (19)
2	27	81.48% (22)	18.52% (5)
Total	112	78.57% (88)	21.43% (24)

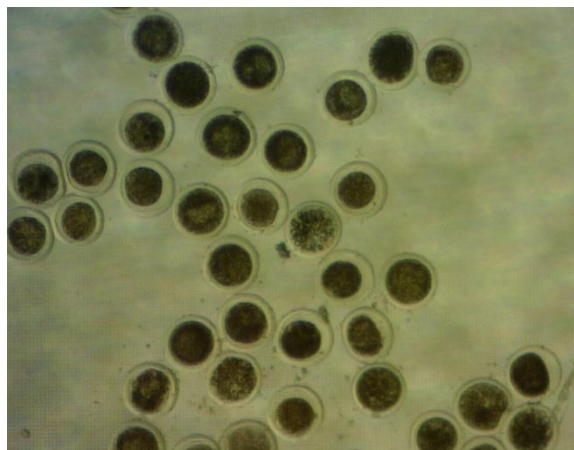


Figura 3. Oocitos fertilizados en el día uno del proceso de fertilización *in vitro*.

### Porcentaje de clivaje y apoptosis.

La división celular embrionaria (clivaje) obtenida fue de 60.20% (53 oocitos) (Cuadro 14; Figura 4). Konrad *et al.* (2013) realizaron un estudio de producción de embriones de búfalo por fertilización *in vitro* luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado usando tres tratamientos y obtuvieron un 78% de clivaje en el primer tratamiento (vaca sin transporte), 70% de clivaje ( vaca transporte 18 horas) y 34% de clivaje (búfala transporte 18 horas) presentando los dos primeros tratamientos un mayor porcentaje y el tercer tratamiento un menor porcentaje a comparación de los obtenidos en nuestro estudio.

López *et al.* (2007) analizaron el efecto del co-ocultivo sobre el desarrollo temprano de embriones clivados a las 48 horas post inseminación y obtuvieron valores de 37%, 32%, 31% y 43% siendo estos datos menores a los obtenidos en este estudio.

En este estudio la muerte celular (apoptosis) obtenida fue de 39.80% (35 oocitos) (Cuadro 14; Figura 5). Martínez Quintero y García Recillas (2013) realizaron la validación de un protocolo de fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano y obtuvieron un 44.5% (45 oocitos) de apoptosis el cual es mayor al

obtenido en este estudio. Isaza *et al.* (2009) compararon dos medios de cultivo de embriones: el KSOMaa y CR1aa alcanzando un porcentaje de apoptosis de 44% y 83% respectivamente, estos valores son mayores a los obtenidos en este estudio.

Cuadro 14. Porcentaje de clivaje y apoptosis.

Repetición	Oocitos fertilizados	Oocitos fertilizados en proceso de clivaje	Oocitos fertilizados en proceso de apoptosis
1	66	62.10% (41)	37.90% (25)
2	22	54.50% (12)	45.50% (10)
Total	88	60.20% (53)	39.80% (35)

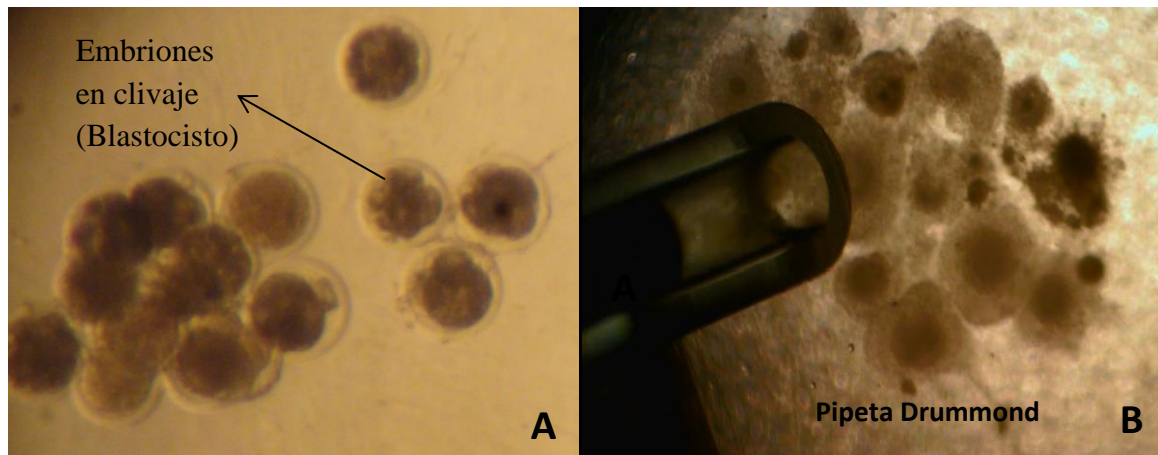


Figura 4. Embriones en clivaje obtenidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de la EAP Zamorano. A) Estados embrionarios de clivaje. B) Selección de blastocistos con la pipeta Drummond.

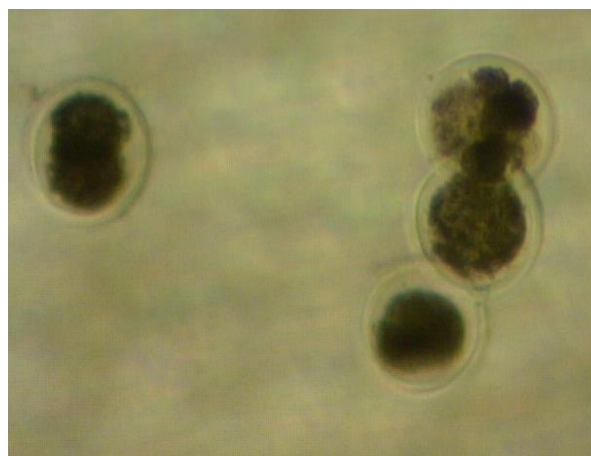


Figura 5. Embriones en apoptosis.

### Porcentaje de blastocistos al séptimo día.

Según el estado embrionario al séptimo día llamado blastocisto, se obtuvo 56.60% (30 blastocistos) utilizando el medio SOF (Cuadro 15; Figura 6).

Las características del desarrollo del embrión *in vitro* fueron las adecuadas, concordando con Díez (2003) quien en su estudio sobre Congelación de embriones bovinos producidos *in vitro* manifiesta que durante el desarrollo *in vitro* los embriones se ven expuestos a choques térmicos, fuentes luminosas, atmósfera gaseosa (5% de CO<sub>2</sub> en aire) y las condiciones del cultivo puede aportar exceso o carecer de los nutrientes necesarios, logrando en este ambiente una tasa de embriones viables de 40% blastocistos al séptimo día.

Los resultados obtenidos fueron inferiores a los reportados por Sánchez Sánchez (2014) quien trabajó en la comparación de dos medios de cultivo *in vitro*: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos, obteniendo un porcentaje de blastocistos al séptimo día de 43.8% y 78% respectivamente.

Dípaz *et al.* (2014) evaluaron la velocidad de desarrollo a blastocisto de embriones bovinos obtenidos *in vitro*, a los días 6, 7 y 8 post fecundación logrando una tasa de blastocistos menor a la de este estudio los días 6 y 7 (46.8%) post fecundación en medio de cultivo comercial.

Cuadro 15. Porcentaje de blastocitos obtenidos al día 7.

Repetición	Número de oocitos fertilizados en clivaje	Porcentaje de blastocistos
1	41	65.90% (27)
2	12	25.00% (3)
Total	53	56.60% (30)

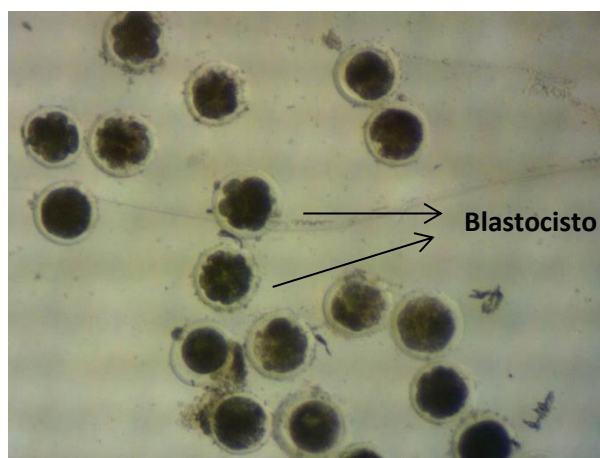


Figura 6. Blastocistos al día 7.

## 4. CONCLUSIONES

- Utilizando el protocolo propuesto por el laboratorio francés Genes Diffusion y bajo las condiciones que presenta el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, se obtuvo similares resultados tanto de número de oocitos viables extraídos así como de oocitos viables por ovario a los resultados de la literatura citada.
- La maduración *in vitro* presentó bajos porcentajes a comparación con otros estudios similares.
- Las tasas de fertilización presentaron un índice mayor en comparación con las investigaciones citadas.
- Los índices de clivaje son menores a los encontrados en estudios realizados por otros autores y el porcentaje de apoptosis es menor a los antes mencionados.
- El porcentaje de blastocistos al día 7 es mayor comparado con el encontrado en la literatura citada.

## 5. RECOMENDACIONES

- Utilizar embriones producidos mediante este protocolo en vacas receptoras para analizar el porcentaje de implantación de los mismos.
- Realizar el protocolo con la técnica de aspiración folicular *in vivo* y comparar con la técnica de punción de ovarios de matadero.

## 6. LITERATURA CITADA

Aller, J., R. Alberio y G. Palma. 2015. Gestación con embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. Revistas electrónicas UACH. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.

Cabrera, P., K. Yoong y L. Gamarra. 2013. Evaluación de la fertilidad *in vitro* de semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados. Universidad Nacional Agraria La Molina. Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (en línea). Lima, Perú. Consultado 30 de agosto de 2015. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/36-Evaluacion\\_fertilidad\\_in\\_vitro.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/36-Evaluacion_fertilidad_in_vitro.pdf)

Díez Monforte, C. 2003. Congelación de embriones bovinos producidos *in vitro*. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Centro de Selección y Reproducción Animal Gijón (en línea). Asturias, España. Consultado 25 de agosto de 2015. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/08-congelacion\\_embriiones.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/08-congelacion_embriiones.pdf)

Dí paz, D., E. Ancco, C. Oriundo, C. Quispe, E. Mellisho. 2014. Developmental speed to blastocyst of bovine embryos production *in vitro*. Asociación Peruana de Reproducción Animal. 4(1): 71-73.

Díez, C., M. Muñoz., J. Caamaño y E. Gómez. 2010. Biotecnologías reproductivas: producción y criopreservación de embriones *in vitro*. Gobierno del Principado de Asturias (en línea). España. Consultado 20 de Mayo de 2015. Disponible en: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>

FAO. 2012. Ganadería Mundial 2011. La ganadería en la seguridad alimentaria (en línea). Roma, FAO. Consultado 14 de Mayo de 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/i2373s/i2373s00.pdf>

FAO. 2010. Las biotecnologías ganaderas en los países en desarrollo. Biotecnologías Agrícolas en la agricultura, la silvicultura, la ganadería, la pesca y la agroindustria (en línea). Guadalajara, México. Consultado 14 de Mayo de 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/biotech/sectoral-overviews/biotech-livestock/es/>

- Fernández, F., J. Hernández y M. Reyes. 2010. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. Revista de salud animal. Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco. México, D.F. 32(2): 21-23
- Gilchrist, R., J. Thompson. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. Theriogenology 67: 6-15.
- González, R., E. Soto., N. Delgado., G. Portillo., A. De Ondiz y J. C. Velarde. 1992. Comparación de dos métodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de Luz. 2: 10.-12
- Herradón, P.G., L.A. Quintela, J.J. Becerra, S. Ruibal y M. Fernández. 2007. Fecundación *in vitro*. Alternativa para la mejora genética en bovinos. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 15(1): 34-41.
- Isaza, V., S. Arango, A. Pareja, O. Camargo y R. Urrego. 2009. Evaluación de dos medios de cultivos sobre la producción *in vitro* de embriones bovino. Revista CES de Medicina Veterinaria Zootecnia 4(2): 39-4.
- Konrad, J., R. Scian., M. Garrido., G. Taminelli y M. Sansinena. 2013. Producción de embriones de búfalo por fertilización *in vitro* luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 24 (2): 97-101
- Kumar, J. 2014. Comparision of culture media for *in vitro* maturation of oocytes of indigenous zebu cows. Master of Science in Theriogenology. Mymensingh, Bangladesh, Agricultural University. 85 p.
- Landínez, J., P. Villamedina., H. Hernández y E. Soto. 2010. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 20: 659- 664.
- López, A., M. Olivera, T. Ruiz y A. Tarazona. 2007. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. Revista Medicina Veterinaria Zootecnia 12(2):1061-1067.
- Liu, Z y R.H. Foote. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O<sub>2</sub>. Biology of Reproduction 53:786-790.
- Madan, M.L. 2005. Animal biotechnology: applications and economic implication in developing countries. Revue Scientifique et Technique Office International Des Epizooties 24(1): 123-139.
- Martínez Quintero, J.L. y J. García Recillas. 2013. Validación de un protocolo de Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 29 p.

Memili, E., H. Sagirkaya, M. Misirlioglu, A. Kaya, N. First, J. Parrish. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultures in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 101: 225-240.

Nagano, M., S. Katagiri y Y. Takahashi. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote the Biology of Gametes and Early Embryos* 14(1): 53-62.

Palma, G. 2001. *Biología de la reproducción*. Argentina. Editorial Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p. 182.

Ratto, M., M. Berland., M. Wolter y R. Matamoros. 1999. Desarrollo de embriones de bovino obtenidos por fecundación *in vitro* cultivados con células oviductales o medio condicionado y transferidos a hembras receptoras. Temuco, Chile. Universidad Católica de Temuco. 25 p.

Reyes, S. 1995. Fecundación *in vitro*: Una nueva reproducción. *Revista de Extensión TecnoVet.* 2 (1): 1-3.

Ruiz, J., L. Landeo., M. Artica., M. Ratto y J. Correa. 2011. Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. Universidad Nacional de Huancavelica. Lima, Perú. 22 (3): 1-5.

Salgado, R., C. Rugeles y J. Alvarez. 2005. Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. Universidad de Antioquía. Colombia. 18 (2): 3-6

Sánchez Sánchez, B.M. 2014. Comparación de dos medios de cultivo *in vitro*: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras. 28 p.

Stojkovic, M., S.A. Machado, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, P. Hutzler, P.B. Goncalves, P.B y E. Wolf. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction* 64: 904-909.

Yang, X., C. Kubota, H. Suzuki, M. Taneja, P.E.J. Bols, G.A. Presicce. 1998. Control of oocyte maturation in cows: Biological factors. *Theriogenology*. 49: 471-482



## 7. ANEXOS

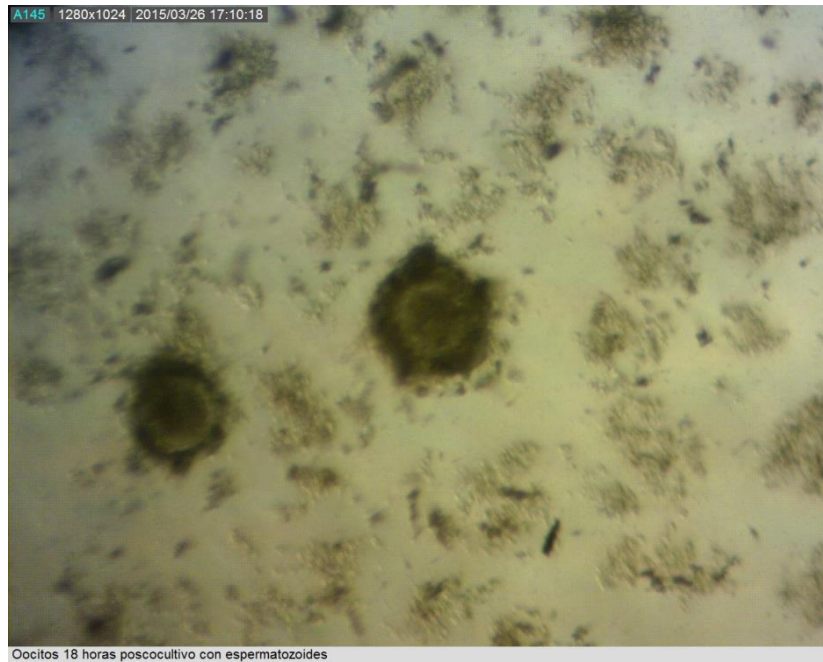
Anexo 1. Etapas del desarrollo embrionario hasta blastocistos (Palma 2001)

<b>Día</b>	<b>Descripción</b>
1	Una célula
2	Dos células
3	Cuatro células
4	Ocho células
5	Dieciséis células – Mórula Temprana
6	Mórula Compacta
7	Blastocisto temprano
8	Blastocisto expandido

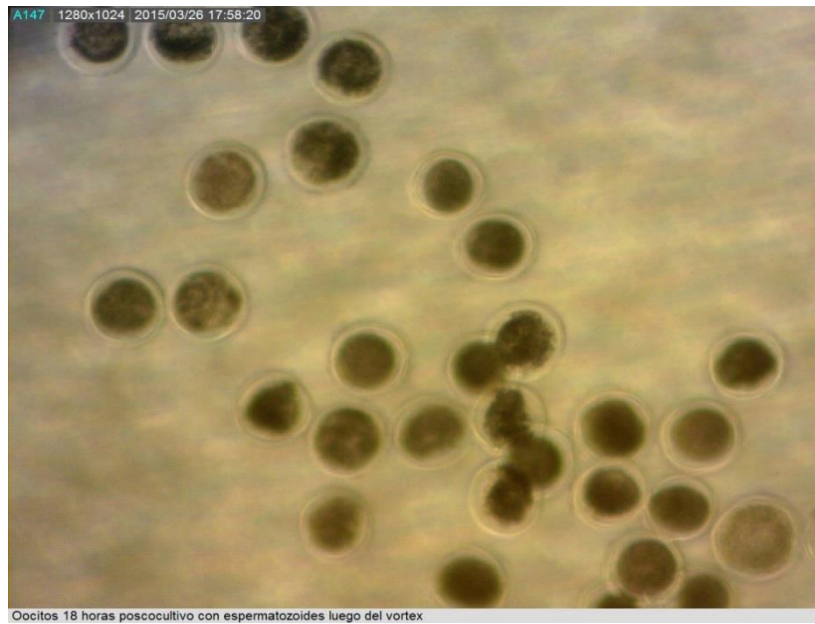
Anexo 2. Oocitos aspirados



### Anexo 3. Oocitos 18 horas poscultivo con espermatozoides



### Anexo 4. Oocitos 18 horas poscultivo con espermatozoides luego del vortex



Anexo 5. Embriones al día 3

