

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

División Regional de Ciencia Animal



**"TÉCNICAS REPRODUCTIVAS EN LA PRODUCCIÓN IN
VITRO DE EMBRIONES DE BOVINOS"**

POR:

CARLOS ABDIEL MORALES COBA

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2002

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
División Regional de Ciencia Animal**

MONOGRAFIA

**"TÉCNICAS REPRODUCTIVAS EN LA PRODUCCIÓN IN
VITRO DE EMBRIONES DE BOVINOS"**

APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA

PRESIDENTE DEL JURADO




M.C. JOSE DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.V.Z. ERNESTO MARTINEZ ARANDA


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
División Regional de Ciencia Animal

MONOGRAFIA


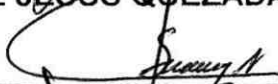


POR

CARLOS ABDIEL MORALES COBA

"TÉCNICAS REPRODUCTIVAS EN LA PRODUCCIÓN IN
VITRO DE EMBRIONES DE BOVINOS"

MONOGRAFÍA ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ
PARTICULAR DE ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE :	 M.C. JOSE DE JESUS QUEZADAGUIRRE
VOCAL:	 M.V.Z. RODRIGO I. SIMON ALONSO
VOCAL	 I.Z. JORGE H. BORUNDA RAMOS
VOCAL:	 I.Z. HECTOR M. ESTRADA FLORES

TORREÓN, COAHUILA

OCTUBRE DE 2002

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por hacer posible la vida y ser nuestro guía en el camino del amor, la verdad y la sabiduría.

A MI ALMA MATER: Por brindarme la oportunidad de ser un profesionalista, ser la madre de mis conocimientos, y por que en ella pase agradables momentos.

A MI ASESOR M.C. JOSE DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE: Gracias por sus consejos y sugerencias durante el transcurso de mis estudios en esta especialidad.

AL M.V.Z. RODRIGO I. SIMON: Por el apoyo brindado, sus observaciones y sugerencias en la elaboración y revisión de este trabajo.

AL I.Z. JORGE H. BORUNDA: Por el apoyo brindado en la revisión de este trabajo.

A MIS AMIGOS, HORACIO, GILBERTO, CHACON, TOLEDO Y ULVER: Por darme la oportunidad de compartir su amistad

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

A esos dos pilares tan preciados en mi vida, a ellos gracias por el gran apoyo que siempre me han brindado y así haber podido alcanzar la meta anhelada de ambos, ahora hecha realidad, les doy las gracias. A DIOS le pido que los bendiga y me los conserve por mucho tiempo.

A MI ESPOSA

Ya que fue un estímulo moral para la terminación de mis estudios profesionales gracias por su invaluable compañía, ánimo, cariño y amor que siempre me brindo en todo momento difícil.

A MI HIJO JOSE CARLOS

Que desde su nacimiento ha colmado de alegría y bendiciones nuestro hogar.

A MIS HERMANOS

Héroes modestos, callados, anónimos que incondicionalmente estuvieron conmigo por verme realizado como MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA..

A LA MEMORIA

De mis abuelos (QEPD), y de mi primo Omar (QEPD)

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN EL LABORATORIO.....	4
4. COLECCIÓN DE OVOCITOS.....	5
4.1 COLECCIÓN DE OVOCITOS DE ANIMALES IN VIVO.....	5
4.2 COLECCIÓN DE OVOCITOS DE ANIMALES POSTMORTEM..	6
5. MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS.....	8
6. FERTILIZACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS.....	10
6.1 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....	11
6.2 FERTILIZACIÓN.....	13
7. CULTIVO DE EMBRIONES.....	14
7.1 CULTIVO IN VIVO DE EMBRIONES.....	14
7.2 CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES.....	15
8. AMBIENTE FÍSICO Y QUÍMICO PARA EL EMBRIÓN.....	17
8.1 LA TEMPERATURA COMO FACTOR.....	17
8.2 LA LUZ COMO FACTOR.....	18
8.3 LA ATMÓSFERA DE GAS COMO FACTOR.....	19
8.4 OSMOLARIDAD COMO FACTOR.....	21
8.5 IMPORTANCIA DEL pH COMO FACTOR.....	21
8.6 SUERO FETAL DE BOVINO O SEROALBÚMINA BOVINA COMO FACTOR.....	22
9. LA SUPEROVULACIÓN.....	22
<i>Cuadro 1. La dosificación de FSH-P de acuerdo a la edad y raza del animal.....</i>	<i>24</i>
<i>Cuadro 2. Niveles de FSH-P según el estado fisiológico.....</i>	<i>24</i>
<i>Cuadro 3. Programa de sincronización - superovulación utilizando un implante de Progestageno (Norgestomet).....</i>	<i>26</i>
10. DESARROLLO, IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES EN LOS BOVINOS.....	27
11. ETAPAS DE DESARROLLO DEL OVOCITO-EMBRIÓN.....	27
<i>Figura 1. Ovocito secundario (Metafase II) de bovino .</i>	<i>29</i>
<i>Cuadro 4. Etapas del blastocito.....</i>	<i>30</i>

<i>Figura 2 Grafico sobre la división celular tras la fertilización</i>	31
11.1 IDENTIFICACIÓN	32
11.2 CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES	33
CONCLUSIONES	36
LITERATURA CITADA	37

1. INTRODUCCIÓN

A finales del siglo XX e inicios del siglo XXI, la reproducción animal, la biología celular y el mejoramiento genético han entrado a una nueva era, en la cual se tienen las herramientas necesarias para una multiplicación rápida de animales, por la implementación de nuevas técnicas reproductivas como son: la producción *in vitro* de embriones, multiplicación de embriones por bipartición y clonación, así como también el sexado de embriones y espermatozoides, sin desmeritar a las técnicas viejas de inseminación artificial y transferencia de embriones

Hay por lo menos dos razones para producir embriones de bovinos *in vitro*. La primera es que se producen grandes cantidades de embriones para la transferencia comercial. La segunda razón es la posibilidad económica de clonar embriones por transferencia nuclear, en la que se requiere que los ovocitos enucleados de ovarios recuperados de rastros sean fertilizados *in vitro* y que el nuevo cigoto sea desarrollado *in vitro* hasta un estadio apropiado para reclonar.

La incorporación de la fertilización *in vitro* en esquemas de evaluación genética y selección para el mejoramiento genético, mediante el uso de la ovulación múltiple para transferencia de embriones

Es importante como una medida para permitir la producción de embriones a partir de vaquillas prepúberes o para incrementar la eficiencia de producción de embriones de donadoras selectas.

En ambos casos se puede obtener ovocitos por vía transvaginal guiada por ultrasonografía. Este tipo de esquemas tiene gran potencial en la evaluación genética ya que reduce el intervalo generacional y la intensidad de selección es mayor para el mérito total, por lo que el cambio genético se puede incrementar sustancialmente.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión de literatura sobre el desarrollo de procedimientos y el estado actual de la producción in vitro de embriones de bovinos.

3. PRODUCCIÓN DE EMBRIONES EN EL LABORATORIO.

La producción de embriones es de gran importancia, ya que es la forma más segura de exportar e importar germoplasma. Además, los embriones son menos propensos que el semen o los animales mismos a abrigar patógenos. De esta manera se pueden preservar genotipos completos.

Otra ventaja de la producción de embriones es su incorporación en esquemas de evaluación genética y selección para el mejoramiento genético, mediante el MOET (Ovulación Múltiple para Transferencia de Embriones), en donde se puede disminuir el intervalo generacional y aumentar la intensidad de selección, por lo que el cambio genético se puede incrementar sustancialmente, este sistema también puede tener sus desventajas, principalmente en la evaluación de efectos maternos, ya que la donadora no cría a su propia descendencia, y por lo tanto el comportamiento de la progenie no contribuye directamente a la predicción de la habilidad materna.

También es importante señalar que la habilidad materna de las hembras receptoras puede enmascarar los efectos genéticos de la progenie y de la donadora. (1, 2,8)

Con la utilización de la PIV de embriones se ha encontrado la aparición de un síndrome, denominado el síndrome del becerro pesado, el cual parece estar asociado a la inclusión de suero en el medio de cultivo, aunque se desconoce el componente activo que lo causa.

4. COLECCIÓN DE OVOCITOS.

Los ovarios de bovino contienen miles de ovocitos, pero con la tecnología actual solo una pequeña porción de ellos se puede utilizar. Para la obtención de los ovocitos se han empleado varias técnicas, tanto en animales *in vivo* como *postmortem*.

4.1 COLECCIÓN DE OVOCITOS DE ANIMALES IN VIVO.

En los últimos años se ha visto un incremento en el número de reportes de recuperación de ovocitos en los animales vivos. Dentro de las técnicas que se realizan están: endoscopia, laparoscopia, aspiración guiada por ultrasonido y/o cirugía. Se han realizado trabajos para recolectar y madurar ovocitos secundarios *in Vitro*, los cuales son recuperados por endoscopia, a través de la piel de la fosa paralumbar. (4,7, 8, 12)

El ultrasonido por vía intravaginal fue utilizado por Callensen et al (1987) para aspirar folículos. Los autores indican que el método tiene ventajas sobre los procedimientos normales de laparoscopia.

Los ovarios fueron retraídos por manipulación rectal y colocados bajo la piel de la región sacro isquiática donde estaba colocado el transductor; los folículos fueron localizados y puncionados para recuperar los ovocitos.

En EUA, los autores reportaron una alta efectividad de la técnica de laparoscopia por medio de la cual ellos recuperaron ovocitos del 79% de los folículos aspirados en vacas superovuladas. Los autores concluyen que permitiendo la visualización y la manipulación del tracto genital, la laparoscopia puede ser un método exitoso, rápido y mínimamente dañino para el tratamiento de varias formas de infertilidad en el ganado. (4, 5)

4.2 COLECCIÓN DE OVOCITOS DE ANIMALES POSTMORTEM.

La obtención de ovocitos en gran escala de vacas sacrificadas en el rastro en forma masiva ha significado grandes ventajas para la producción *in vitro* de embriones. Las técnicas que se han empleado son la aspiración de ovocitos y la disección de ovario. La aspiración es mas practica por la velocidad de operación, pero ambas son igualmente efectivas.

Solamente los folículos entre 2 a 8 milímetros (mm) de diámetro proporcionan ovocitos con un buen porcentaje de desarrollo, ya que los ovocitos adquieren la habilidad de iniciar la meiosis cuando llegan al 80% de su tamaño final.

Los ovocitos recuperados de folículos menores a 1.6 mm están en crecimiento y todavía no han alcanzado un estado meioticamente competente por lo que los ovocitos obtenidos de folículos menores a 2 mm presentan una reducción en el porcentaje de maduración y fertilización comparados con folículos mayores.

El máximo número de ovocitos recuperados por ovario, utilizando folículos mayores a 2 mm, son cerca de 10. Se ha encontrado que los ovarios de vacas proveen un menor número de ovocitos aceptables que las vaquillas productoras de carne, que son sacrificadas a los 2 a 3 años de edad.(1, 4, 7)

5. MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS.

La maduración de ovocitos del ganado bovino se puede llevar a cabo in vitro, los cuales se pueden fertilizar y continuar su desarrollo embrionario, con éxito han desarrollado desde soluciones simples de sales balanceadas hasta medios complejos para la maduración de ovocitos, basándose en los elementos que están presentes in vivo, para proporcionar las condiciones ideales, con el fin de obtener el mayor porcentaje de ovocitos madurados.

Algunos de los elementos o factores que se han analizado y utilizado son: Osmolaridad, pH, Gonadotropinas: Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH), Estrógenos (estradiol).

Así como células somáticas para co-cultivo (células del cúmulo, granulosa, teca interna, oviducto, útero, células del hígado de rata búfalo), aminoácidos, factores de crecimiento (IGF-I, EGF, TGF- α y TGF- β), suero de vaca en estro, suero fetal bovino (BFS, por sus siglas en inglés).

El medio m-199 es el que generalmente se emplea en la maduración de ovocitos, y usualmente esta suplementado con gonadotropinas (FSH/LH), estradiol, suero sanguíneo y piruvato, el cual da altas frecuencias de maduración nuclear y expansión del cúmulo cuando se agrega FSH. (2, 12, 13, 20)

Las gonadotropinas son necesarias para el desarrollo y maduración de los ovocitos. La LH influye en la maduración del ovocito, altera la concentración de calcio dentro del ovoplasma, incrementa la glucólisis e incrementa la oxidación mitocondrial de la glucosa dentro del ovocito.

La FSH estimula la actividad aromática de las células de la granulosa, convirtiendo el microambiente folicular androgénico a estrogénico. Además, la FSH incrementa la expansión de las células del cúmulus que rodea al embrión, por lo que se puede decir que la FSH interviene más en el desarrollo que en la maduración del ovocito.

Los estrógenos son importantes para la maduración de los ovocitos, sensibilizan los receptores de las células de la granulosa para responder a las gonadotropinas; si se utilizan células de la granulosa como co-cultivo, no se requiere añadir estrógenos al medio de cultivo. Hay un efecto favorable del estradiol en el medio de maduración, el cual llega a ser evidente en el día 7 del estadio de desarrollo del embrión.

El suero de vaca en estro, el BFS y la BSA son fuentes proteicas, pero además de contener aminoácidos también contienen hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y otras sustancias que el ovocito y el embrión requieren para su desarrollo.

Se sabe que las células somáticas para co-cultivo secretan ciertos factores que favorecen la maduración normal del ovocito, incrementando la fertilización y el desarrollo embrionario.

Por medio del co-cultivo con células de la granulosa del folículo ovárico y la selección rigurosa de ovocitos de calidad recuperados de folículos mayores a 3 mm se pueden obtener un gran número de embriones, cercanamente a los porcentajes normales obtenidos con la técnica de transferencia de embriones *in vivo*.

Los valores de desarrollo embriológico hasta mórula o blastocito son: Madurados y fertilizados *in vivo*, un 55%; madurados *in vivo* y fertilizados *in vitro*, un 45%; y madurados y fertilizados *in vitro*, de un 23 a 63%. Aunque los ovarios de las vacas contienen miles de folículos en crecimiento menores a 1 mm, todavía es un reto para la ciencia madurar y cultivar ovocitos de este estadio, aunque se ha tenido éxito con ovocitos del ratón. (11, 12, 13, 16)

6. FERTILIZACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS.

La segunda parte de la PIV es la FIV, en donde se lleva a cabo la capacitación espermática y el proceso de fertilización. (8)

6.1 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.

Para realizar una fertilización in vitro es esencial tener disponible una forma de preparación espermática. Se han utilizado numerosos sistemas de capacitación, incluyendo medios con alto poder iónico y glucosaminoglicanos como la heparina y el sulfato de fucosa, envejecimiento, cambio de pH, ionóforos de calcio y cafeína y fluido del oviducto. En general, cualquier agente que cause entrada de Ca^{++} , dentro del acrosoma del espermatozoide, y cause un incremento en el pH, causara capacitación espermática. Uno de los métodos más efectivos es el que utiliza glucosaminoglicanos (heparina) para la capacitación espermática. (8)

Entre los métodos comúnmente utilizados están: el método de percol, el método " Swim-up " y el método de filtración " Glass-wool ". Estos métodos son utilizados en la capacitación espermática y purificación del semen. El método del percol es uno de los más utilizados, obteniendo con el buenos resultados; el método " Swim-up " del semen es un procedimiento mas lento (requiere 1 hora aproximadamente para su realización) y no ha dado mejores resultados que el procedimiento que se realiza con percol; el método de filtración "Glass-wool" es otra alternativa para la purificación espermática, que tiene la ventaja que provee semen con una viabilidad cercana al 100%.

Los lavados por sedimentación y resuspensión a través de la centrifuga ayudan a separar los materiales indeseables (crioprotectores) del semen congelado de una forma rápida y efectiva, además aumentan la motilidad espermática.

La motilidad progresiva de los espermatozoides es un factor que se tiene que controlar en la FIV para que el espermatozoide pueda llegar y penetrar la zona pelucida del ovocito maduro. El toro es otro factor de variabilidad en la fertilidad, ya que ciertos toros o un grupo de toros pueden presentar más altos porcentajes de fertilización que otros .(4, 8)

La BSA se incluye normalmente en los medios de capacitación espermática, ya que se han encontrado efectos benéficos en la capacitación de los espermatozoides.

Se cree que tiene una función importante en la separación del colesterol y zinc sobre la membrana del espermatozoide, estabilizándola durante la capacitación .Con una capacitación espermática apropiada, preincubación e incubación en medio libre de suero a temperatura corporal, pH entre 7.6 a 7.8, la fertilización in vitro ha sido un éxito con porcentajes de fertilización tan altos como 70% a 80% en bovinos, así como también en ovinos y caprinos .

6.2 FERTILIZACIÓN.

Consiste en la interacción entre los componentes del ovocito y los del espermatozoide, activándose la segunda división meiótica del ovocito y la restauración del número cromosómico del futuro individuo. La descondensación de la cabeza del espermatozoide ocurre dentro de 1 a 2 horas de haber penetrado al ovocito, y el pronúcleo masculino se forma de 3 a 5 horas.

La concentración espermática en la FIV es de 0.5 a 1 millón de espermatozoides por mililitro y para lograr un buen porcentaje de fertilización hay que incubar por 24 horas después de la maduración y fertilización. Si se observan los dos cuerpos polares dentro del gameto femenino quiere decir que se llevo a cabo la fertilización. La fertilización generalmente se realiza en microgotas de HEPES, a un pH de 7.8. también se utiliza PHE (penicilina, hipotaurina y epinefrina) como estimulante de la motilidad espermática.

Antes de la fertilización generalmente se retiran las células del cumulus de los ovocitos maduros, y este proceso se puede realizar por pipeteo o la adición de citrato de sodio al 3%, sin efectos adversos, con el propósito de limpiar al ovocito. (1, 2, 5, 8,)

7. CULTIVO DE EMBRIONES.

Existen dos sistemas de cultivos de embriones: el sistema de cultivo in vivo y el sistema de cultivo in vitro.

7.1 CULTIVO IN VIVO DE EMBRIONES.

La utilización de oviductos de conejas como un sistema de cultivo in vivo se ha visto que es efectivo para el desarrollo de las primeras etapas de los embriones . También se han utilizado borregas en lugar de conejas, en las que también se ha visto favorecido el desarrollo de los embriones .

En la borrega usualmente se introducen cientos de cigotos de bovinos dentro de un oviducto ligado unas cuantas horas después de la ovulación, la cual es generalmente controlada por progestágenos y gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, por sus siglas en ingles). La cantidad de embriones recuperados es muy variable, y depende de factores del animal y experiencia del técnico . (8,13 20)

7.2 CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES.

Para replicar las condiciones naturales del microambiente del oviducto, se han desarrollado dos sistemas para el cultivo in vitro de embriones, que son: la utilización de medios definidos para cultivo de embriones (KSOM, CR1aa, CR2, TCM199, CZB, SOF, USU, Ham F-10, Menezo B, etc.) y la utilización de co-cultivos. En este último caso existen diferentes tipos celulares: células de la granulosa, células epiteliales de oviducto de bovino (BOEC, por sus siglas en inglés), y líneas celulares establecidas (células Vero), etc. (8,12,13)

Los medios de cultivo para embriones contienen aminoácidos, hormonas (como la insulina o factores de crecimiento) para incrementar el transporte de la glucosa, y sueros (como: suero fetal de bovino, suero de vaca preñada). Todas estas sustancias se añaden al medio de cultivo, para regular y favorecer el desarrollo del embrión .

De algún modo, cuando el cultivo de los embriones de vaca, oveja y cerda es realizada in vitro, el desarrollo es bloqueado en el estado donde se da la transición de control maternal a control embriogénico de desarrollo; siendo este para el bovino y ovino el estadio de 8 a 16 células, y para la cerda de 4 a 8 células .

Los embriones pueden ahora ser cultivados a través de estos periodos donde el desarrollo es bloqueado, por medio de la adición de monocapas de células somáticas al medio de cultivo .

El papel de material embriotrónico de las células del oviducto se desconoce, excepto para las ovejas donde se cree que es una glicoproteína rica en fructosa .

El desarrollo se mejora aún más si la glucosa se remueve del medio (Ellington et al., 1990). El empleo de BOEC como co-cultivo propicia un buen ambiente para el desarrollo final del embrión , pero la utilización de células de la granulosa ha dado mejores resultados , mientras que la utilización de células de hígado de rata búfalo o de la teca interna, han dado resultados variables .

Es importante considerar esta parte de la PIV, ya que la habilidad para cultivar embriones in vitro es esencial para la aplicación exitosa de la clonación de embriones, sexado y transferencia de genes.(7, 8, 15)

8. AMBIENTE FÍSICO Y QUÍMICO PARA EL EMBRIÓN.

Tanto el ambiente físico como el químico se deben mantener lo más cercano posible al ambiente uterino, ya que los embriones no toleran grandes cambios en ambos ambientes.

Las principales variables que se tienen que cuidar dentro de estos ambientes son: Temperatura, luz, atmósfera de gas, osmolaridad, pH, utilización de suero fetal de bovino o seroalbumina bovina.

8.1 LA TEMPERATURA COMO FACTOR.

El embrión se puede mantener a la temperatura del cuarto por algunas horas sin efectos adversos. En un estudio realizado se demostró que la temperatura óptima para la maduración in vitro de los embriones es de 38 a 39° C, mientras que para la fertilización y cultivo in vitro la temperatura óptima es 39° C.

Se han demostrado efectos detrimentales a los 40°C, particularmente durante la fertilización del ovocito y desarrollo del embrión, por lo que es absolutamente necesario utilizar equipos de alta calidad con control preciso de la temperatura. (9, 10)

8.2 LA LUZ COMO FACTOR

Como parte de la rutina de maduración, fertilización y cultivo *in vitro* de los embriones de bovino, es inevitable su exposición a diferentes cantidades de luz natural y artificial.

Según los resultados de un estudio realizado en conejos, se sugiere no comprometer la maduración y la fertilización *in vitro* si no es necesario.

Los efectos adversos se pueden dar particularmente por la luz ultravioleta, pero la inclusión de ácido para-aminobenzoico (PABA) como ocurre en los mamíferos, ha sido sugerido como medida de protección .

En un estudio realizado en Bélgica con embriones de ratón se demostró que la luz no es un factor limitante durante la micromanipulación de los embriones . Por lo que se recomienda no exponer los ovocitos o embriones a la luz mas de lo necesario, ya que los eventos de maduración ocurren normalmente en la oscuridad en el tracto reproductivo de la hembra.

8.3 LA ATMÓSFERA DE GAS COMO FACTOR.

Es necesario tener un riguroso control de la atmósfera para incubar los embriones, ya sea 5% de bióxido de carbono (CO_2) en aire, o 5% de CO_2 , 5% de oxígeno y 90% de nitrógeno, utilizando un máximo de humedad relativa para prevenir la evaporación del medio. Hay ciertas actividades que se realizan fuera de la incubadora (preparación y lavado de los espermatozoides, remoción parcial de cúmulos del ovocito, etc.), quedando el medio expuesto al aire. (9, 10)

Estas operaciones generalmente se realizan en la campana de flujo laminar, donde la temperatura, humedad y la fase de gas son totalmente diferentes alas de la incubadora.

Auque el medio modificado TALP empleado está bufferado con HEPES, se recomienda que estos procedimientos sean realizados lo mas pronto posible. Se ha demostrado que una baja tensión de oxígeno (5%) es más benéfica para el desarrollo del embrión de bovino en un medio libre de proteína y en ausencia de células del oviducto de bovino. Los diferentes cocultivos pueden requerir diferentes concentraciones de oxígeno para resultados óptimos.

El mecanismo exacto por el cual el CO_2 ejerce su acción no se conoce, posiblemente tenga efecto sobre el pH intracelular, el cual se sabe que es un potente regulador del metabolismo. Cuando se utilizan microgotas de medio para el cultivo de embriones cubiertas con aceite, el oxígeno agregado en la incubadora debe pasar a través del aceite para que sea consumido por el embrión.

En un estudio realizado en Irlanda, se evaluó el efecto de los niveles de oxígeno y bióxido de carbono en el cultivo de embriones de bovino, y se encontró variables en diferentes atmósferas tales como :

- a. Mezcla de 10% de CO_2 en aire;
- b. Mezcla de 5% de CO_2 , 5% de O_2 , 90% de N_2 ;
- c. Mezcla de 5% de CO_2 , 10% de O_2 , 85% de N_2 .

Como resultado se observó que estos últimos no tuvieron ventaja sobre la convencional de 5% de CO_2 en aire.

Utilizando el procedimiento estándar de fertilización *in vitro*. Sin embargo, otros reportes sugieren que cuando se utiliza la mezcla de gas 5% de CO_2 , 5% de O_2 , y 90% de N_2 , los resultados son marginalmente mejores que la combinación 5% de CO_2 en 95% de aire . (9, 10)

8.4 OSMOLARIDAD COMO FACTOR.

Los embriones sufren rápida contracción y expansión como resultado de ligeros cambios en la concentración de sales de los medios (colección, maduración, congelamiento, etc.), que pueden reducir la sobrevivencia de los embriones transferidos.

Si la osmolaridad del medio es menor a la del ambiente uterino, el embrión absorberá agua y se hinchará hasta explotar, y al contrario, si la osmolaridad es mayor, el tamaño del embrión se encogerá lo cual también es detrimental para la sobrevivencia del mismo.

La membrana del embrión de bovino aparentemente es muy flexible, la cual tolera cambios en osmolaridad entre 285 a 1700 miliosmoles (mOsm), la osmolaridad del medio se recomienda mantenerla a 290 mOsm. (9, 10)

8.5 IMPORTANCIA DEL pH COMO FACTOR

Es importante mantener un pH de 7.4. Se pueden utilizar soluciones que presenten cambios mínimos en el pH cuando son expuestas a la atmósfera, como el medio PBS (pH 7.4), y se debe tener cuidado de grandes cambios en el pH cuando se utilizan medios de bicarbonato bufferado (MEM, TCM-199, Ham's F-10) si estos se exponen a la atmósfera. Cuando se usan estos medios el pH se mantiene por medio de una atmósfera artificial de gases. (9, 10)

8.6 SUERO FETAL DE BOVINO O SEROALBÚMINA BOVINA COMO FACTOR

Se adiciona uno u el otro al medio para reducir la adhesión de los embriones a la superficie de los tubos o cristalería. El suero también supe algunos factores nutritivos, los cuales incrementan la viabilidad de los embriones *in vitro*. También se deben agregar al medio de congelamiento de los ovocitos, ya que ambos se consideran como crioprotectores extracelulares. (9, 10)

9. LA SUPEROVULACIÓN.

La superovulación es una técnica muy utilizada para la recolección de ovocitos/embriones *in vivo*. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la superovulación todavía no está bien comprendido. La demostración de que la gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, por sus siglas en inglés) induce la ovulación múltiple, estableció las bases de la superovulación.

Esta hormona está presente en la sangre de la yegua entre los días 40 y 130 de la gestación, y posee una actividad biológica de FSH y LH posteriormente se utilizó la FSH de pituitaria porcina (FSH-p), la cual demostró tener una respuesta mayor y más consistente en la superovulación que la PMSG. La FSH comercialmente disponible contiene cantidades

variables de LH. El máximo nivel de contaminación aceptable con LH en una preparación de FSH es del 15 al 20% del contenido original del extracto. En la actualidad existe un producto llamado Folltropin (Vetrepharm Inc, Canadá) el cual parece estar menos contaminado de LH.

Se recomienda no superovular mas de 3 a 4 veces por año. Si se estimula continuamente en la vaca se puede causar desde una sobreestimulación de los ovarios hasta la formación de quistes foliculares a fibrosis ovárica. (3, 6, 13)

La dosis óptima de FSH-p a utilizar varia de 18 a 40 mg, y se puede basar en dosificar dependiendo de la edad y raza de la hembra a superovular (Cuadro 1). O en el estado fisiológico de la hembra (Cuadro 2),

Las dosis totales se dividen en 2 aplicaciones diarias por 4 días, o sea, 8 aplicaciones. También se puede hacer una sola aplicación de la dosis total de FSH en la región de la escápula, en lugar de las 8 dosis en 4 días.

Esto es importante, particularmente con el ganado de carne o cebú, los cuales son muy susceptibles a estrés . En cualquier programa, si la vaca donadora muestra estro al tiempo de la última inyección de FSH, esta no debe de ser aplicada. (3, 6, 13)

Cuadro 1. La dosificación de FSH-P de acuerdo a la edad y raza del animal.

Edad	Bos taurus (*)	Bos indicus (*)
Vaquilla de 16 meses	18 mg	16 mg
Vaquilla de 2 años	20 mg	18 mg
Vaquilla primer parto	28 mg	20 mg
Vaca madura (3 a 12 años)	34 mg	28 mg
Vaca vieja (> 12 años)	38 mg	32 mg

*Son dosis totales, y se dividen en 2 aplicaciones diarias por 4 días (8 aplicaciones).

Cuadro 2. Niveles de FSH-P según el estado fisiológico

Estado fisiológico	Día de aplicación	Dosis	
		AM	PM
Vacas Lactando	1	6 mg	6 mg
	2	5 mg	5 mg
	3	4 mg	4 mg
	4	3 mg	3 mg
Vacas Secas	1	5 a 4 mg	5 a 4 mg
	2	4 a 3 mg	4 a 3 mg
	3	3 a 2 mg	3 a 2 mg
	4	2 mg	2 mg
Vaquillas	1	4 a 3 mg	4 a 3 mg
	2	3 a 2 mg	3 a 2 mg
	3	3 a 2 mg	3 a 2 mg
	4	2 mg	2 mg

Adaptado de Ramírez – Godínez y Miller (1995).

La disponibilidad de sincronizadores permite programar a la donadora para ser superovulada, de manera que al iniciar el tratamiento de superovulación, ésta se encuentre entre el día 9 y 14 del ciclo estral, provocándole ovulaciones múltiples en vez de una sola ovulación.

En la actualidad existen diversos productos, algunos de los que se pueden utilizar como sincronizadores son: prostaglandina $F_{2\alpha}$ o sus análogos (Dinoprost, Clorprostenol, etc.), o se puede utilizar progesterona natural o progestágenos como el norgestomet. (3, 6, 13, 18)

La disponibilidad de prostaglandina $PgF_{2\alpha}$ o de sus análogos ha incrementado la eficiencia de la superovulación y ha permitido flexibilidad en la programación de la donadora.

Con la utilización del norgestomet (Progestageno en presentación comercial de implante) se ha logrado superovular mejor a las vacas donadoras en un tiempo muy corto. Además la utilización de progestágenos puede ayudar a sacar a las vacas del anestro posparto. El programa a utilizar dependerá de la etapa del ciclo estral en que se encuentre la hembra (Cuadro 3). (3,18,19)

Estos tres programas se desarrollaron con la finalidad de disminuir la exposición de la vaca a la progesterona por más de 10 días, ya que esto disminuye la calidad de los embriones.

Cuadro3. Programa de sincronización - superovulación utilizando un implante de Progestageno (Norgestomet).

PROGRAMA 1			PROGRAMA 2			PROGRAMA 3		
Hembra en celo			Hembra cercana al estro			Hembra en ciclo tardío		
Día	AM	PM	Día	AM	PM	Día	AM	PM
0	Donadora en estro		0	Implantar Donadora		0	Implantar Donadora	
9	FSH	FSH	7	FSH	FSH	3	FSH	FSH
10	FSH	FSH	8	FSH	FSH	4	FSH	FSH
11	FSH	FSH	9	FSH	FSH	5	FSH	FSH
				Explante			Explante	
12	FSH	FSH	10	FSH	FSH	6	FSH	FSH
13	Estro	I.A.	11	Estro	I.A.	7	Estro	I.A.
14	I.A.		12	I.A.		8	I.A.	
21	Colectar embriones		18	Colectar embriones		14	Colectar embriones	

AM=mañana, PM=tarde, FSH= hormona foliculo estimulante, IA= inseminación artificial

La inseminación artificial se debe de llevar a cabo a las 12 a 14 horas de iniciado el estro, utilizando doble dosis. En caso de que la donadora acepte una monta a las 24 horas, este es el tiempo de la segunda inseminación, entonces se recomienda inseminar una tercera vez a las 36 horas de iniciado el estro con una sola pajilla.

En algunas ocasiones se utiliza semen de dos o tres toros diferentes y la progenie se identifica después del nacimiento de acuerdo al tipo sanguíneo. (10,12,13)

10. DESARROLLO, IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE EMBRIONES EN LOS BOVINOS.

Uno de los principales problemas para los técnicos es la identificación y clasificación de los embriones en base a su desarrollo. Es importante tener conocimiento de todo esto, ya que es una parte importante del proceso de la PIV de embriones.(8. 10)

11. ETAPAS DE DESARROLLO DEL OVOCITO-EMBRIÓN.

Desde el nacimiento, las becerras presentan ovocitos en la primera fase de la primera división meiótica (profase I) en reposo, denominados ovocitos primarios, los cuales están formados por un citoplasma (vitelo) y un núcleo grande (vesícula germinal).

Los ovocitos primarios están rodeados por una capa plana de células foliculares, y al iniciar el desarrollo folicular se formará la zona pelúcida

La zona pelúcida queda entre la membrana vitelina y la capa más interna de las células de la granulosa y corona radiata.

Esta primera división meiótica se completa después del pico preovulatorio de la Hormona Luteinizante (LH), formándose el ovocito secundario y el primer corpúsculo o cuerpo polar (restos de cromatina). Éste ovocito está conformado por la zona pelúcida, la vesícula germinal y el área que se encuentra entre la vesícula germinal y la zona pelúcida, que se le conoce como espacio perivitelino.

El ovocito secundario, en la mayoría de las especies al momento en que se da la ovulación, se encuentra en metafase II de la segunda división meiótica (Figura 1), aquí se detiene el desarrollo y solamente continuará con la penetración del espermatozoide durante la fertilización.

Al momento de la fecundación se completa la segunda división meiótica liberándose el segundo cuerpo polar y formándose el cigoto o embrión de una célula; a partir de esta etapa el embrión formado se comienza a dividir.

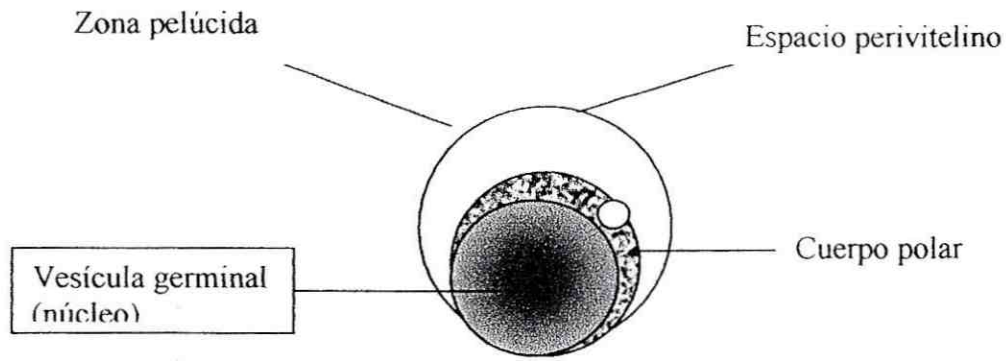


Figura 1. Ovocito secundario (Metafase II) de bovino .

A las células que componen el embrión se les denomina blastómeros, y durante el desarrollo embriológico los blastómeros incrementan su número en una forma geométrica (1,2,4,8,16) hasta llegar al estadio de 16 células, después comienza una serie de divisiones asincrónica hasta llegar a un estadio de 40 a 60 células donde es difícil distinguir los blastómeros y se le conoce como mórula compacta, la cual es generalmente recuperada 5 a 7 días después del estro. (Figura 2.)

Al final del estadio de mórula los blastómeros comienzan a diferenciarse, originando 2 tipos de células: trofoblastos y masa celular interna. Estas células llegan a ser distinguibles en la fase de blastocito, donde hay una capa de células trofoblásticas (forman la placenta) rodeando a una cavidad llamada blastocele. La masa celular interna formará al feto. Los blastocitos son encontrados de 7 a 10 días de terminado el estro.

El blastocito consta de 3 fases bien diferenciadas denominadas :

1er fase	Blastocito temprano
2da Fase	Blastocito
3er fase	Blastocito tardío

La diferencia entre estas fases de los blastocitos radica en la cantidad de blastocele en relación con la masa embrionaria que presentan. (14)

Cuadro 4. Etapas del blastocito

Etapa	Relación Blastocele / Masa Embrionaria
Blastocito temprano	< 50 % de Blastocele
Blastocito	50 % de Blastocele y 50 % de Masa embrionaria
Blastocito tardío	> 50 % de Blastocele

Posteriormente se forma el blastocito expandido, en el cual se comienza a expandir la masa celular interna y empieza a desaparecer el citoplasma, dando lugar al blastocito extruido, donde crece la masa celular interna rompiendo la zona pelúcida y saliendo de ella, y por último se forma la gástrula, donde el embrión se encuentra completamente fuera de la zona pelúcida. (8,10,13,14,16)

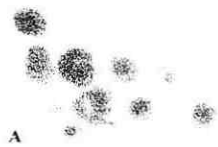

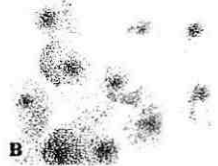



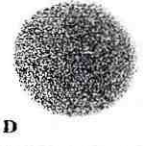
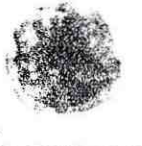
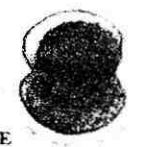
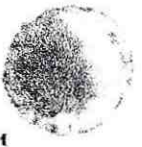
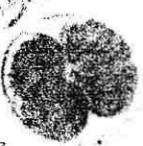

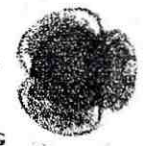



<i>Día de la PIV</i>	Etapa	Foto	<i>Día de la PIV</i>	Etapa	Foto
-1	A) Ovocitos inmaduros		3	I) Embrión de 8 a 16 células	
0	B) Ovocitos maduros		3 a 4	J) Embrión > 16 células	
0	C) Ovocitos fertilizados		4 a 6	K) Morula compacta	
0 a 1	D) Embrión de 1 célula		5 a 7	L) Morula compacta/ blastocisto temprano	
1	E) Embrión de 2 células		6-8	M) Blastocisto	
1 a 2	F) Embrión de 2 células segmentándose		7-9	N) Blastocisto expandido	
2	G) Embrión de 4 células		8-9	O) Blastocisto extruido	
2 a 3	H) Embrión de 8 células		8-9	P) Blastocisto extruido	

Figura 2 Grafico sobre la división celular tras la fertilización.

11.1 IDENTIFICACIÓN.

El embrión de bovino tiene un diámetro de aproximadamente 160 μm (0.16mm) hasta el día 8 de desarrollo. Por lo tanto, se requiere de un microscopio estereoscópico (aumento de 10 a 40 X) para identificar los embriones. La morfología de los embriones de bovino es similar después de la fertilización hasta el día 9 de desarrollo. La zona pelúcida se pierde del blastocito entre el día 8 y 10.

En este periodo existe un gran riesgo de dañarlo por el manejo, además de que son muy adhesivos y se pegan fácilmente a los tubos ya la cristalería. La identificación de los embriones se basa en varias características morfológicas:

- 1.- La zona pelúcida es una estructura translúcida presente en todos los embriones hasta el día 9, se distingue fácilmente de otros desechos celulares y es utilizada como referencia.
- 2.- El color del embrión (ámbar oscuro) facilita la identificación por que usualmente es más oscuro que otros desechos celulares.
- 3.- El conocimiento del estadio del embrión facilita su identificación.
- 4.- El embrión es esférico y tiende a moverse en el fondo de la superficie del plato (3, 6, 13)

11.2 CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES

Los embriones son clasificados de calidad excelente a mala, basándose en su apariencia morfológica .

- a) **Calidad 1. (Embrión excelente)** No tiene imperfecciones visibles.

- b) **Calidad 2. (Embrión bueno)** Presenta una pequeña imperfección, como puede ser un blastómero extruido, forma asimétrica o desarrollo ligeramente retardado comparado con otros embriones del mismo cultivo o lavado uterino.

- c) **Calidad 3. (Embrión regular)** Tiene más de una imperfección y usualmente está retardado en su desarrollo 1 a 2 días.

- d) **Calidad 4. (Embrión malo o pobre)** Presenta signos de degeneración celular, sin o con poca organización celular y más de 2 días de retardo en su desarrollo.

- e) **Calidad 5.** Son embriones severamente degenerados y no son transferibles.

- f) **Calidad 6.** Son embriones sin fertilizar o consisten solamente de zona pelúcida.

En un estudio realizado se comparó la calidad del embrión contra el porcentaje de preñez, y se observó que los embriones de excelente calidad presentaron un 63% de preñez, los de buena calidad 58%, los regulares 31% y los malos 12%.

A través de la observación de las características del embrión podemos hacer muchas determinaciones: Por el número de células presentes en el embrión podemos estimar su edad; el color muy oscuro o muy claro de los blastómeros puede indicar que ha ocurrido un proceso degenerativo; grandes vesículas son indicativas de degeneración; los blastómeros extruidos son indicativos del mal desarrollo o degeneración.

Un pequeño número de blastómeros extruidos usualmente no es detrimental para el desarrollo posterior del embrión, pero un gran número (mas de 5) indica que el embrión posiblemente sufre una degeneración mas que el proceso de desarrollo.

La proporción del espacio perivitelino ocupado por el embrión es menor en el estadio de mórula compacta. (5, 7, 8, 15,16, 17)

Consideraciones en la clasificación de embriones descongelados:

1. El color de los embriones descongelados usualmente es más oscuro que los congelados debido aun incremento de células muertas.
2. El embrión descongelado es usualmente más pequeño, especialmente la cavidad blastocélica.
3. Puede haber daño extensivo en la zona pelúcida como cuarteaduras, desgaste o pérdida de la zona pelúcida.
4. Se puede perder la viabilidad si una gran porción del embrión es material extruido.
5. El número de inclusiones vesiculares grandes indica la extensión del daño al esqueleto citoplasmático; ésta probablemente indica destrucción masiva de organelos.
6. El grado en el que el embrión llena la cavidad de la zona pelúcida es indicativo de calidad embrionaria, demasiada deshidratación del embrión causa demasiado encogimiento, causando daño mecánico.
7. Si las células están todavía compactas, la calidad es mejor que si estuvieran sueltas, ya que se destruyen las uniones de célula a célula, disminuyendo la probabilidad de preñez.
8. Si la apariencia del embrión es favorable comparada con la apariencia antes del congelamiento, las oportunidades de preñez se mejoran.
9. Las cuarteaduras de la zona pelúcida no necesariamente significan que los embriones están dañados. (5, 7, 8, 15,16, 17)

CONCLUSIONES

Después de realizar la revisión bibliografía y tras el análisis de la literatura citada, se desarrollo la presente monografía con información actual, y se llevo a las siguientes conclusiones:

1. El valor económico de un programa de Transferencia de Embriones (MOET), no solamente radica al obtener crías de excelente calidad genética, si también en que puede aumentar la velocidad de los avances en el mejoramiento genético.
2. Dentro de los procedimientos sobre la Transferencia de Embriones (MOET), se debe establecer cuales de estos son los más viables tanto en efectividad como económicamente pues a nivel experimental todos demostraron ser eficaces en mayor a menor grado.
3. A través de la observación de las características del embrión se debe realizar una clasificación adecuada, esta debe ser realizada por personal altamente calificado y en donde este personal puede o debiese ser un Medico Veterinario Zootecnista,
4. Se hace patente que se deben realizar una mayor cantidad de estudios de investigación, tendientes a simplificar y mejorar las técnicas usadas en la actualidad del MOET, buscando sustentabilidad así como competitividad.

LITERATURA CITADA

1. ARTHUR GH, NOAKES DE, PEARSON H. Veterinary reproduction and obstetrics 6th ed. London; Balliere Tindal 1989 161 – 72
2. BEARDEN, J. y FUGUAY, J. 1982. Reproducción Animal Aplicada. México: Manual Moderno. p. 108-116.
3. BURTON LJ, Oct. 1998. Sincronización del estro con PGF2 alfa administradas en Vacas lecheras lactantes, Theriogenology 50(6):905-15
4. CALLESEN H., T. GREVE, Y F. CHRISTENSEN. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. Theriogenology 27:217-223.
5. DIETRICH ET.AL. 1980, Endocrinología y Fisiología de la Reproducción de los animales , Editorial acribia, 1^a Edición, Zaragoza España
6. DIELEMAN SJ, BEVERS MM. PMSG/Anti – PMSG in cattle : a simple and efficient superovulatory Treatment. 1993 ; 39:25-41
7. ELLINGTON, J. E., P. B. FARELL, , M. E. SIMKINN, Y R. 1990 *In vitro* development potential of bovine zygotes in oviduct epithelial cell coculture systems. Theriogenology 33:1.
8. H. FOOTE. E. W. CARNEY 1990. *In vitro* development coculture systems. Theriogenology 12:34:1.
9. GANONG, W. 1996. Fisiología Médica. 15^a Edición. México Manual Moderno p. 381-383. Qp31.G36
10. GODKE RA, POOL SH. Follicular development, superovulation and artificial insemination in embryo donor cattle
11. GURTLER, H. Et Al. 1979. Fisiología Veterinaria. 2^a Edición. Editorial Zaragoza. Acribia.
12. HAFEZ, ESE. 1989. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 5^a Editorial México. Interamericana. SF768.H33

13. MC DONALD. 1983. Reproducción y Endocrinología Veterinarias, Editorial Interamericana, 2ª edición, p. 97-101, 419-436. México, D.F.
14. MERCK & CO. INC. 1993. El Manual Merck de Veterinaria, manejo de la reproducción: ganado bovino, editorial océano/centrum; 4ª. Edición, Barcelona-España.
15. SIROIS J, FORTUNE JE. Ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. Biology of reproduction 1989;39:308-17
16. SORENSEN, A. M. 1989. Reproducción animal, principios y practicas. Editorial interamericana McGraw-Hill, México, D.F.
17. SPORRI, H y STUNZI, H. 1977. Fisiopatología veterinaria. Zaragoza. Acribia.
18. SUMANO, OCAMPO.1997. Farmacología Veterinaria, 2ª edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill, México, D. F.
19. VADEMÉCUM VETERINARIO IPE.1999. 1ª edición, Editorial Rezza Editores S. A.
20. ZEMJANIS, R. 1981. Reproducción Animal, Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas. Editorial Limusa, S.A. México, D. F.