

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL
CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Producción de embriones in vitro en bovinos

Por:

Lucio Gómez Hernández

MONOGRAFIA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México.

Agosto 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL
CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Producción de embriones in vitro en bovinos

Por:

Lucio Gómez Hernández

MONOGRAFIA

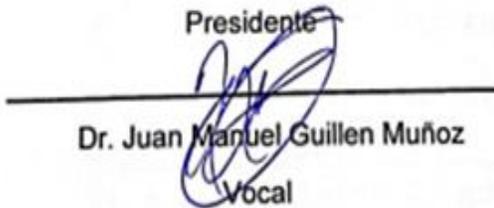
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA



Dr. Juan Luis Morales Cruz

Presidente



Dr. Juan Manuel Guillen Muñoz

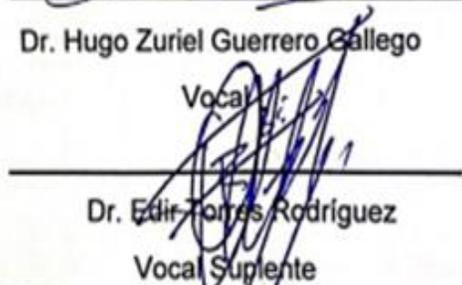
Vocal

Aprobada por:



Dr. Hugo Zuriel Guerrero Gallego

Vocal



Dr. Edir Torres Rodríguez

Vocal Suplente



MC. José Luis Francisco Sandoval Elias

Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México.

Agosto 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL
CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Producción de embriones in vitro en bovinos

Por:

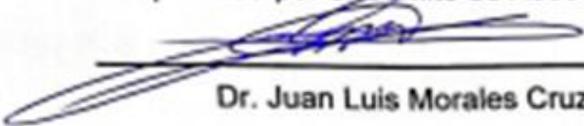
Lucio Gómez Hernández

MONOGRAFIA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Juan Luis Morales Cruz


Dr. Hugo Zuriel Guerrero Gallego


Dr. Juan Manuel Guillen Muñoz


MC. José Luis Francisco Sandoval Elías

Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México.

Agosto 2023

I. Agradecimientos.

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y guiarme por el camino correcto.

A mi mamá Irene Hernández Arguello pues sin ella no lo había logrado, tu bendición a diario a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien y por haberme formado como un hombre de valores.

A mi padre Lucio Gómez Sáenz por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme a trabajar por mis sueños y a no rendirme ante las adversidades.

A mis hermanos Alan y Dulce María por estar presentes aportando buenas cosas a mi vida y por toda la felicidad que me regalan.

A mis compañeros y amigos por los buenos momentos que hemos compartido y en especial un cariñoso reconocimiento a los que me han demostrado su apoyo y brindado sus ánimos y consejos durante la carrera.

A mi Alma Mater por abrirme las puertas para mi formación profesional y cumplir el sueño que tuve desde niño de ser médico veterinario zootecnista.

A mi asesor principal Dr. Juan Luis Morales Cruz por la orientación y ayuda en la realización de este trabajo, por sus conocimientos y apoyo brindado.

II. Dedicatoria.

A Dios por guiarme por el camino correcto, porque nunca me ha abandonado, gracias por haberme dado una excelente familia, por permitirme conocer excelentes profesores y amigos y porque has llenado mi corazón con la luz de tu espíritu dejando que cumpla esta meta.

A mi familia a quienes amo y que gracias a su apoyo pude concluir mi carrera y por haber creído en mí.

A mis ángeles Ramón Hernández Sánchez y Rosario Hernández Arguello que Dios los tiene en su gloria, sé que están muy orgullosos de mí y mis logros que desde el cielo me bendicen.

III. Resumen.

La producción de embriones *in vitro* en vacas aumenta la productividad al aumentar la cantidad de terneros de una sola madre de alto valor genético. Para obtenerlos conlleva un procedimiento de obtención de los ovocitos ya sea directamente de ovarios o por aspiración folicular *in vivo* para posteriormente ser transportados al laboratorio donde se someterán a procedimientos que imitan las condiciones naturales de la madre utilizando medios de cultivo. Se divide en tres etapas principales que en orden cronológico son: maduración de ovocitos, fertilización de ovocitos maduros y cultivo de embriones.

Palabras clave: Embriones, *In vitro*, Cultivo, Ovocitos, Maduración, Fecundación

IV. Índice.

Índice.

I. Agradecimientos.....	i
II. Dedicatoria.....	ii
III. Resumen.....	iii
IV. Índice.....	iv
Índice.....	iv
V. Índice de tablas y figuras.....	v
I. Introducción.....	1
II. Objetivo.....	2
III. Revisión de literatura.....	3
3.1 Uso de los embriones producidos <i>in vitro</i> en la ganadería.....	3
3.2 Selección de vacas donadoras de ovocitos y receptoras de embriones. ...	3
3.3 Perspectivas actuales de la producción de embriones <i>in vitro</i>	5
3.4 Técnica de laboratorio para la producción de embriones <i>in vitro</i>	7
3.4.1 Etapas de producción de los embriones <i>in vitro</i>	7
3.5 Obtención de ovocitos.....	9
3.6 Maduración.....	14
3.7 Fertilización.....	17
3.7 Cultivo.....	20
3.8 Preparación de la receptora de embrión y transferencia del mismo.....	22
3.9 Criopreservación del embrión.....	24
IV. Conclusiones.....	25
V. Recomendaciones.....	25
VI. Literatura citada.....	26

V. Índice de tablas y figuras.

<i>Esquema 1 Etapas de producción de embriones in vitro.....</i>	<i>8</i>
<i>Esquema 2 Proceso de aspiración de ovocitos.....</i>	<i>12</i>
<i>Esquema 3 Proceso de capacitación espermática</i>	<i>18</i>
<i>Ilustración 1 Ovocitos de diferentes etapas.....</i>	<i>13</i>
<i>Ilustración 2 Ovocitos en las 4 clasificaciones.....</i>	<i>14</i>
<i>Ilustración 3 Ovocitos inmaduros (izquierda) y ovocitos maduros (derecha)</i>	<i>15</i>
<i>Ilustración 4 Ovocitos siendo fecundados.</i>	<i>19</i>
<i>Ilustración 5 Embriones en diferentes etapas.....</i>	<i>22</i>
<i>Ilustración 6 Sitio donde se deposita el embrión.</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 1 Clasificación de ovocitos.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 2 Sincronización de receptoras de embriones.....</i>	<i>23</i>

I. Introducción.

Las nuevas biotecnologías tienen la finalidad de producir animales y multiplicar a los que son genéticamente superiores mediante la producción de embriones *in vitro*. Estas biotecnologías pueden ayudar a aumentar la producción de proteína de origen animal necesaria en todo proyecto sobre soberanía alimentaria, se considera importante realizar una investigación de los conceptos y estado actual de la biotecnología de producción de embriones *in vitro* (Fernández et al., 2007).

La PIV conlleva tres pasos que en orden cronológico son: recolección de ovocitos, maduración de los mismos, fertilización de ovocitos maduros y cultivo de embriones (Goicochea et al., 2021).

La técnica comienza con la recolección de ovocitos mediante aspiración folicular o con ovarios de rastro. Los ovocitos recolectados son madurados utilizando gonadotropinas y factores de crecimiento. Los espermatozoides son capacitados en el laboratorio. Para fertilizar se utiliza un cultivo de espermatozoides y ovocitos con un medio que les favorece (Gonella et al., 2013).

II. Objetivo.

Realizar una revisión de literatura actualizada sobre la producción de embriones *in vitro*.

III. Revisión de literatura.

3.1 Uso de los embriones producidos *in vitro* en la ganadería.

Esta técnica tiene como objetivo conseguir crías de alto nivel genético, mejorando la productividad (Goicochea *et al.*, 2021).

Esta biotecnología reproductiva que ya tiene años mejorándose con el fin de reproducir de manera artificial la producción de embriones. En un principio solo tenía fines de investigación, pero con la evolución de la ganadería se volvió algo comercial, con esto los medios de cultivo se estudiaron más para simplificarlos y mejorar el desarrollo embrionario, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables. Actualmente el uso de esta biotecnología va en ascenso por las ventajas que presenta (Rodríguez *et al.*, 2011).

3.2 Selección de vacas donadoras de ovocitos y receptoras de embriones.

Donadoras de ovocitos.

La selección debe basarse en tres criterios: mérito genético de la descendencia, capacidad reproductiva y valor comercial (Acevedo, 2016).

Mérito genético: se debe considerar características objetivas y cuantificables como: peso al destete, peso al año, conversión alimenticia, ganancia diaria de peso, habilidad materna, producción lechera y valor de la canal (Carbalo *et al.*, 2010).

Capacidad reproductiva: se debe hacer una evaluación reproductiva mediante palpación transrectal y/o ecografía de los ovarios y del útero para descartar cualquier anomalía como: quistes foliculares, adherencias, endometritis, metritis (Nathalia, 2014).

El valor comercial de la donadora se lo da el mejoramiento genético y productividad que esta brinda (Nathalia, 2014).

La elección de los toros para la fertilización de los ovocitos obtenidos de las donantes también es muy importante (Carballo *et al.*, 2010).

Esta donante debe cumplir estas características reproductivas:

- Buen historial reproductivo.
- Completamente sana.
- Ciclos estrales regulares.
- Condición corporal de 3.5 a 5.
- No haber tenido problemas en partos anteriores.
- Entre 3 y 10 años.
- Con menos de 2 servicios por concepción.
- Parámetros productivos superiores.

(Nathalia, 2014).

El manejo de las donadoras es crítico, si estas no están reproductivamente bien y en un estado corporal adecuado el programa puede fracasar (Zambonino, 2014).

Receptoras de embriones.

Las receptoras son otra parte esencial del programa, esta es la hembra capaz de recibir un embrión y llevarlo al termino (parto) además de criar y permitir que exprese su potencial genético (Albeiro, 2001).

También es importante hacer un seguimiento de las estructuras ováricas, se debe tener un cuerpo lúteo y concentraciones plasmáticas de progesterona siendo lo necesario para proporcionar un ambiente uterino adecuado para promover el desarrollo del embrión (Iroleguy, 2011)

Criterios a considerar en receptoras:

- Buen tamaño, general como reproductivamente.
- Sistema mamario apto para amamantar.
- Valorar el canal del parto del animal, este debe ser ancho, esto para la facilidad del parto.
- Tener de 1 a 2 lactancias.

- El periodo posparto no debe ser menor de 90 días.
- Involución uterina completa y no estar en amamantando.
- Tener un peso promedio de 400 kg o más.
- Condición corporal mayor a 3 (en una escala del 1 al 5).
- No estar preñada, estar ciclando y completamente sana.
- Libre de enfermedades reproductivas (Acosta, 2020).

Se debe tener presente que las receptoras tengan su calendario de vacunación completo, estén desparasitadas y suplementadas con sales minerales o soluciones inyectables (Albeiro, 2020).

Es muy importante la sincronización de receptoras, un mayor control en la sincronización de los estros, además de asegurar una función lútea posterior al estro sincronizado, adecuada para la supervivencia del embrión transferido (Colazo *et al.*, 2007).

3.3 Perspectivas actuales de la producción de embriones *in vitro*.

Las tecnologías de reproducción asistida (TRA) son herramientas referidas a la reproducción animal que en los últimos años ha tenido un avance muy notable. El enfoque de estas tecnologías es maximizar el número de descendientes animales genéticamente superiores y diseminar la genética por el mundo. (Ferre *et al.*, 2020).

Esta técnica es un importante avance tecnológico que beneficia la reproducción de las especies domésticas y también una alternativa comercial en reproducción intensiva de hembras de alto valor genético (Solís *et al.*, 2020).

La transferencia comercial de embriones en el ganado se ha convertido en una industria bien establecida. Su impacto es alto debido a la calidad de animales que producen. Se utiliza mayormente para ganancia genética real, especialmente en la industria lechera utilizando semen de toros provenientes de transferencia de embriones. El sexado de embriones como de semen es igual de exitoso (Mapletoft, 2013).

Los medios de fertilización *in vitro* mediante numerosas formulaciones promueven la fusión de gametos y el desarrollo embrionario. Se evaluaron dos medios

diferentes FERT-TALP y TCM199. Se concluyó que con el medio FERT TALP hubo un mayor porcentaje de clivaje a las 18 y 48 horas pos- fertilización y embriones bovinos de 4 a 8 células en comparación con el medio TCM-199 modificado. (Goicochea *et al.*, 2021).

El medio de fertilización para la producción de embriones *in vitro* es importante para el desarrollo en etapas posteriores, se evaluó los porcentajes de fertilización, clivaje y embriones al día ocho al suplementar cafeína en el medio de Fertilización *in vitro* (FIV). Concluyendo que la adición de cafeína no mejora los porcentajes de fertilización, clivaje y embriones obtenidos al día 8 de cultivo, los porcentajes de maduración *in vitro* fueron similares para los tratamientos FIV + cafeína y FIV control, además la eficiencia general del procedimiento FIV fue similar para los tratamientos FIV + cafeína y FIV control (Ponce *et al.*, 2020).

Al evaluar el efecto de dos concentraciones de O₂ (5% O₂ y 20% O₂) en la producción de embriones bovinos *in vitro* se obtuvo que con la concentración de 20% de O₂ hay mejores resultados por etapa de maduración y fertilización. Mientras que con la concentración de 5% de O₂ obtienes mayores porcentajes de clivajes, embriones y blastocitos. Pero al final la concentración de 5% de O₂ resulto con mejores porcentajes de embriones producidos (Murillo *et al.*, 2021).

Se evaluó la bipartición y la crio preservación en el desarrollo de embriones. Se concluyó que la bipartición y la crio preservación por vitrificación no afecta el desarrollo *in vitro* de los blastocitos producidos *in vitro* mientras tanto la crio preservación por curva lenta afecta el desarrollo. Por ello la crio preservación por vitrificación es la técnica más viable para conservar blastocitos y hemiembriones producidos *in vitro* (García, 2020).

Los antioxidantes previenen la oxidación disminuyendo el porcentaje de oxígeno. Se concluyó que una atmosfera baja de 2% de O₂ incrementa el porcentaje de embriones *in vitro*, también mejora la calidad obteniendo un mayor número de blastómeros. Sin embargo, en cultivo de mayor atmosfera de 5 a 20% reduce su protección (Delgado, 2018).

3.4 Técnica de laboratorio para la producción de embriones in vitro.

La Fecundación *In Vitro* (FIV) se realiza completamente en laboratorio, implica la maduración y fusión de gametos femeninos y masculinos en un ambiente creado con la finalidad de producir embriones. (Ponce *et al.*, 2020).

Se divide en tres pasos exceptuando la recolección de ovocitos, que en orden cronológico son: Maduración de ovocitos, Fecundación de ovocitos maduros y cultivo de embriones (Salgado *et al.*, 2020).

3.4.1 Etapas de producción de los embriones in vitro.

La producción de embriones in vitro se divide en 4 etapas: recolección de ovocitos, maduración, fertilización y cultivo.

- a) En la primera etapa se colectan ovocitos *in vivo* mediante la aspiración folicular o con ovarios de rastro

- b) Los ovocitos ya en el laboratorio con ayuda de diversos medios son sometidos a maduración *in vitro*

Los espermatozoides son capacitados, adquiriendo la capacidad para fertilizar.

- c) La fertilización *in vitro* es la fase en la que los ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y así poder ser fecundados.

- d) Por último, los ovocitos fertilizados se exponen a nutrientes y sustancias que apoyan la división celular y el crecimiento embrionario para mantener su sobrevivencia y desarrollo (Gonella, 2013).



Esquema 1 Etapas de producción de embriones in vitro.

3.5 Obtención de ovocitos.

Al nacer la hembra bovina puede tener hasta 75,000 ovocitos en cada ovario. A pesar de ello solo logra tener de 4 a 6 crías en su vida (Rivera, 2022).

El ovocito coopera con la mitad del material genético embrionario y con todo el citoplasma del cigoto, proporcionando los organelos, proteínas y demás componentes celulares necesarios para el desarrollo temprano (Gonella, 2013).

Los folículos son la unidad fundamental del ovulo encontrándose en diferentes fases de desarrollo, la obtención de estos permite aprovechar los no ovulatorios, que en condiciones fisiológicas normales se atresian (Fernández *et al.* 2010).

Existen diferentes técnicas de aspiración de ovocitos:

- Hembras vivas: Aspiración folicular (Ovum Pick-Up; OPU) guiada por ultrasonido de animales vivos.
- De material del matadero: Se realiza de forma post-mortem, una vez que el animal ha sido sacrificado y se ha retirado el ovario.

Aspiración folicular (OPU).

Viene de las palabras Ovum Pick Up, o punción ovárica y su objetivo es obtener cada ovocito alojado al interior de cada folículo ovárico. El sistema de aspiración folicular guiado por ultrasonido consta de un ecógrafo, una bomba de aspiración y una aguja, también dispone de un sistema guiado conectado a un recipiente de recolección y una sonda (Camargo *et al.*, 2012).

La técnica se realiza ubicando el transductor en el ovario a puncionar. El dispositivo se maneja desde el exterior con una mano mientras la otra es introducida en el recto fijando el ovario con el transductor visualizando los folículos en la imagen del ultrasonido; ya fijado el ovario, haciendo movimientos suaves es perforada la pared vaginal con la aguja y los folículos son aspirados por la bomba de vación y recolectados (Camargo *et al.*, 2012).

Preparación del equipo.

-Mesa para el equipo. Esta debe estar limpia y desinfectada con una solución de agua y clorhexidina.

-Baño María. Se prepara 10 minutos antes, utilizando agua destilada y se coloca sobre la mesa. La temperatura debe estar a 37°C. Aquí es donde van los tubos de ensayo donde se almacenarán los ovocitos.

-Ecógrafo. Instalarlo correctamente y verificar que la imagen sea la adecuada.

-Sonda de aspiración. Debe estar limpia y desinfectada.

-Bomba de vacío. Debe estar limpia y conectada la salida al tubo de ensayo que contiene 5 ml de medio para mantenimiento de ovocitos, todo esto dentro del baño maría para evitar un estrés térmico.

-Pedal de la bomba de succión. Al presionar, origina una presión negativa de succión de alrededor de 89 psi.

Procedimientos para la aspiración de ovocitos.

Primero se verifica que los materiales no falten en la mesa.

En vacas muy nerviosas se usa acepromazina como tranquilizante.

Ya con la donadora en la prensa se aplica lidocaína al 2% (anestésico local) esto para evitar contracciones del recto y favorecer la manipulación de los ovarios y evitando el dolor al momento de la punción con la aguja.

Se introduce la mano en el recto y se realiza una evacuación de heces, seguido se hace limpieza en la vulva. Entonces se introduce la sonda de aspiración por el tracto genital de la vaca con camisa de protección, aguja de aspiración y un poco de gel lubricante.

La aguja de aspiración se ubica en la parte superficial del ovario, evitando introducirla y así evitando lesiones, hemorragias e infecciones.

Los ovocitos y el líquido folicular son succionados y llevados al tubo de ensayo.

El tubo de ensayo debe ser identificado con el número de la vaca que se trabajó y se pasa al laboratorio de fertilización *in vitro*.

Terminada la aspiración vamos a encontrar un líquido rojo debido a la mezcla de sangre y el medio que se utilizó. Finalmente terminada la aspiración los tubos de ensayo son llevados al laboratorio de fertilización *in vitro* donde se hace la búsqueda, maduración y fertilización de los ovocitos y congelación de los embriones (Orellana *et al.*, 2007).

Del matadero.

El proceso de obtención de ovocitos en vacas de rastro se realiza de forma post-mortem, una vez que el animal ha sido sacrificado y se ha retirado el ovario para someterlos al proceso de aspiración, el tamaño ideal del ovocito debe ser de 3 y 6 milímetros (Ramírez, 2020).

Materiales a utilizar

- Ovarios de rastro.
- Jeringas de 5 ml.
- Agujas número 18.
- Solución salina.
- Recipiente de plástico.
- Tubos de recolección de ovocitos.

Procedimiento.

Los ovarios recolectados son llevados del rastro al laboratorio en un contenedor con una mezcla de solución salina + antibiótico a temperatura ambiente (hasta 22 °C hasta por 5 horas) (Ramírez, 2020)

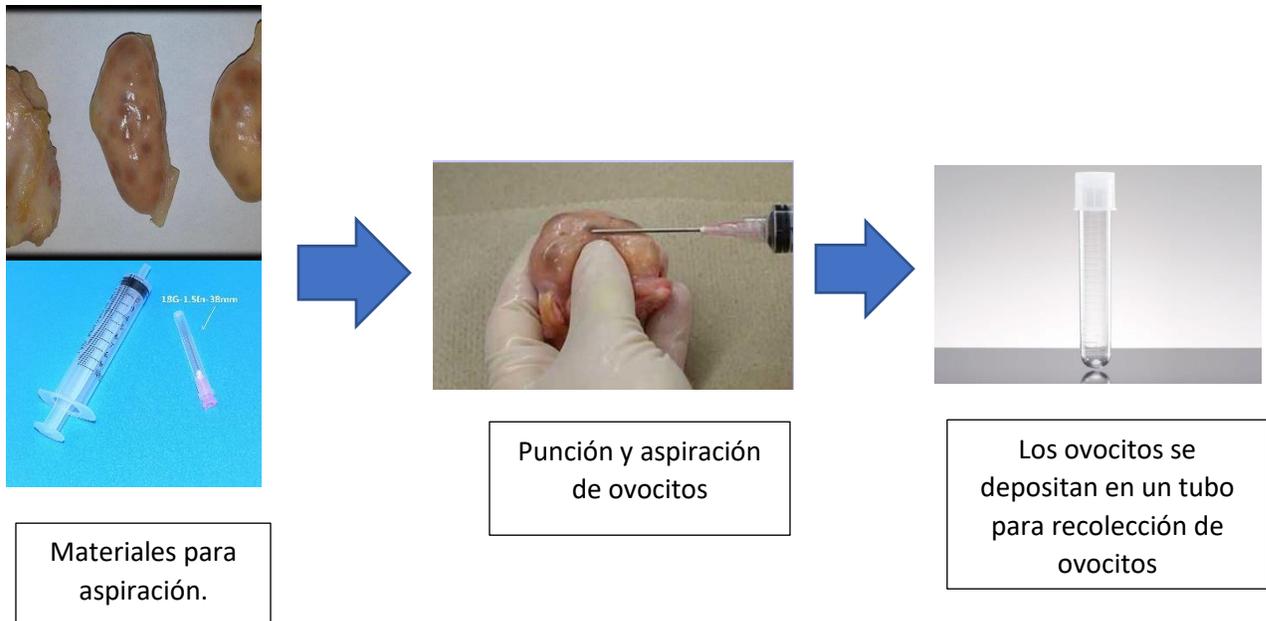
Ya en el laboratorio los ovarios se enjuagan dos veces con etanol al 70% + solución salina, esta solución debe mantenerse en una temperatura de 35 –37°C (Ramírez, 2020).

La aspiración se realiza con jeringa hipodérmica de 5 ml y aguja del número 18, la jeringa debe contener 1 ml de solución salina para amortiguar los ovocitos.

Se toma el ovario del recipiente y se seca suavemente.

Se punzan los folículos y se aspiran los ovocitos dividiendo el ovario en tres caras.

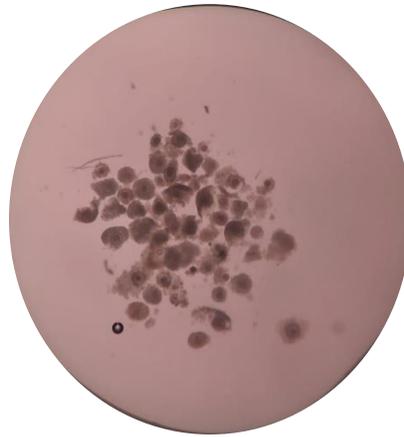
Al terminar de aspirar el ovario, el contenido es depositado en tubos para recolección de ovocitos estos dentro del recipiente con solución a temperatura de 35-37 °C.



Esquema 2 Proceso de aspiración de ovocitos.

Búsqueda de ovocitos

Ya en el laboratorio el líquido recolectado en el tubo de ensayo es filtrado, se enjuaga con buffer fosfato salino, se vuelve a filtrar hasta que desaparezca el color rojizo de la sangre. El líquido que queda en el filtro es colocado en una caja Petri para localizar y valorar los ovocitos. Este paso es muy importante dado que del 25% al 40% de ovocitos van alcanzar el estadio para ser un embrión viable (Orellana *et al.*, 2007).



(CBR, 2023)

Ilustración 1 Ovocitos de diferentes etapas.

Clasificación de ovocitos.

La clasificación se basa en tres criterios: diámetro de los ovocitos, aspecto de su citoplasma y las características de las células del cumulus que los rodea, estas células dan soporte nutricional y hormonal durante la fase de maduración (Crespo *et al.*, 2015).

El diámetro define la capacidad para madurar, un ovocito menor a 110 μm no tiene capacidad para madurar. Los ovocitos que contienen un cumulus oophorus compacto tienen mayor porcentaje de llegar a ser un embrión viable. A diferencia de los que solo presentan corona radiata (Crespo *et al.*, 2015).

Los ovocitos que muestran un ovoplasma oscuro tienen una gran acumulación de lípidos y aumenta su potencial de desarrollo a diferencia que los que presentan una coloración pálida. Aunque los ovocitos que presentan una coloración negra es porque están envejecidos y su potencial de desarrollo es muy baja (Crespo *et al.*, 2015).

Tabla 1 Clasificación de ovocitos.

Clasificación de ovocitos		
Clasificación.	Calidad	Características a evaluar
A	Bueno	Completamente rodeado por más de 3 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo.
B	Regular	Rodeado parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.
C	Malo	Desnudo.
D	Degenerado	Rodeado por fibrina (con aspecto de tela de araña).

(Adaptado de Liebfried L and First N L, 1979; Sato E y col, 1990)

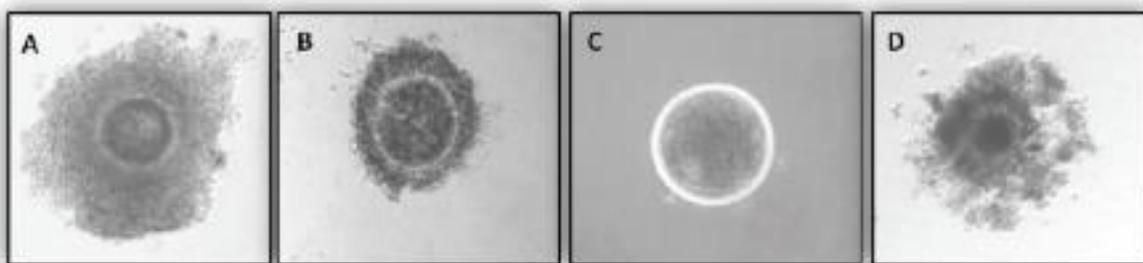


Ilustración 2 Ovocitos en las 4 clasificaciones.

3.6 Maduración.

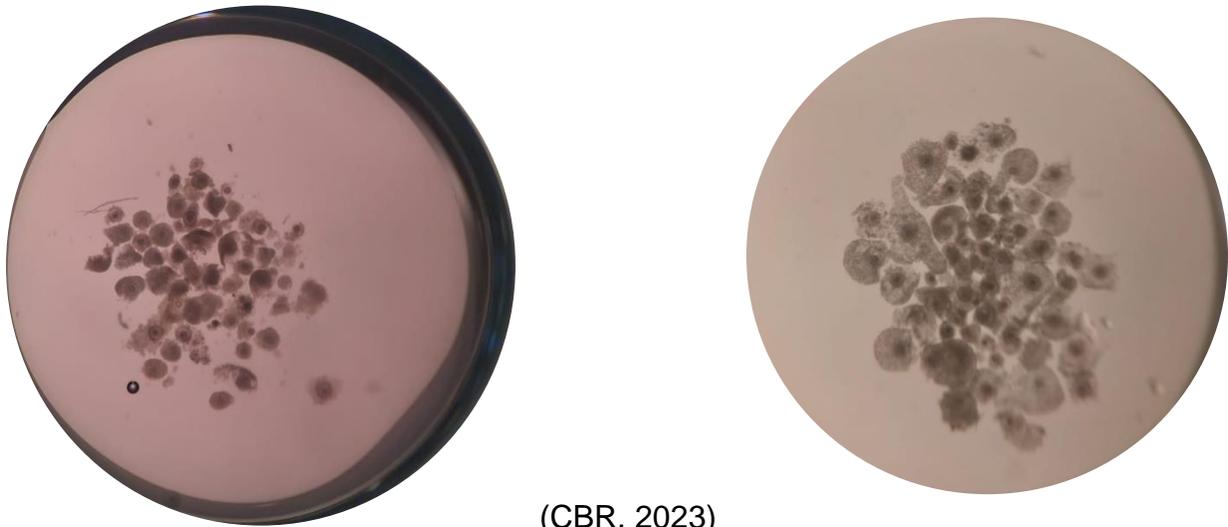
Esta es la fase en la que se simula lo que sucede en los cuernos uterinos, después de la ovulación (Orellana et al., 2007).

En esta fase los ovocitos adquieren la competencia para ser fecundados (Salgado et al., 2020).

Para lograr la maduración se asimila las condiciones del oviducto como: temperatura, pH, presión osmótica y la composición atmosférica (Crespo et al, 2015).

Los ovocitos, a lo largo de la maduración, llegan al estadio de Metafase dos (MII), en la que adquieren competencia citoplasmática y genética (Salgado *et al.*, 2020).

También se necesita que las células del Cúmulus que lo rodean, se expandan y produzcan sustancias que permitan el fin de la maduración, sólo así estará listo para ser fertilizado. Esto usualmente tarda alrededor de 24 horas (Salgado *et al.*, 2020).



(CBR, 2023)

Ilustración 3 Ovocitos inmaduros (izquierda) y ovocitos maduros (derecha)

Medios de cultivo para la maduración in vitro de ovocitos bovinos.

Los ovocitos mediante numerosas formulaciones de medios de maduración, bajo diferentes condiciones y protocolos para alcanzar la etapa de blastocito.

Medio de cultivo tisular 199 (TCM 199).

Es el medio estándar: el TCM 199 se usa en la mayoría de laboratorios con o sin suplemento de suero (Lino *et al.*, 2021).

La suplementación con factores o hormonas aumentan la maduración citoplasmática a diferencia de otros (Espin *et al.*, 2018).

Fluido sintético de oviducto SOF.

Se compone de fluido del oviducto ovino más albumina sérica bovina. Teniendo una tensión baja de oxígeno (5-7%) el desarrollo aumenta (Espin *et al* 2018).

El medio basal Eagle BME

Es un medio sintético para apoyar el crecimiento de células in vitro. Debe complementarse, generalmente con suero fetal bovino (FBS) al 10%. BME utiliza un sistema de tampones de bicarbonato sódico (2,2 g/l) y, requiere un ambiente con un 5-10 % de CO₂ para mantener el pH fisiológico (Thermo Fisher Scientific).

Aditivos:

- Hormona folículo estimulante (FSH).
- Hormona luteinizante (LH).
- Factor de crecimiento epidérmico (EGF).
- Factor de crecimiento insulínico (IGF).
- Insulina transferina insulínico (ITS).
- Beta estradiol.
- Glucosa.

Procedimiento.

- Paso 1: Preparar las cajas para la maduración, colocando gotas de 20 µl de medio de maduración.
- Paso 2: cubrir con 3,5 ml de aceite mineral.
- Paso 3: y adicionar a cada gota 30 µl más de medio.
- Paso 4: Marcar las cajas así: MIV, consecutivo del proceso, fecha y número de caja.
- Paso 5: Guardar la caja en la incubadora de CO₂.
- Paso 6: En una caja extra realizar el lavado de los ovocitos de la siguiente forma: colocar dos gotas de 100 µl de HEPES y una gota de 100 µl de medio de maduración.
- Paso 7: Tomar los ovocitos seleccionados, lavarlos y pasarlos por las dos gotas de HEPES y por la gota con medio de maduración.

- Paso 8: Finalmente, sembrar entre 10 y 12 ovocitos en cada gota de la caja de maduración e incubar por 24 horas a 38,6°C, 6% CO₂ y 90% de humedad

(Cardona et al., 2014).

3.7 Fertilización.

Es también conocida como inseminación, procedimiento por el cual los ovocitos maduros son cultivados junto con espermatozoides y así poder ser fecundados. Son grupos de alrededor de 30 ovocitos depositados en microgotas que contienen medios de fertilización; a los que se le adicionan espermatozoides móviles previamente purificados y capacitados mediante estimulación enzimática.

La meiosis se completa después de la fecundación ya cuando el ovulo es un cigoto (Salgado *et al.*, 2020).

Los eventos fisiológicos que ocurren en esta fase son: la capacitación espermática, penetración al ovulo, unión de gametos y formación de pronúcleos (Salgado *et al.*, 2020).

Selección espermática.

Es un paso esencial donde se seleccionan los espermatozoides más móviles, además se retiran sustancias no deseadas como diluyentes y crioprotectores (De León *et al.*, 2021).

Swim-Up.

El método de Swim-Up es un procedimiento que permite seleccionar aquellos espermatozoides con mayor capacidad para ascender en un medio de cultivo.

Consta en verter el semen descongelado en un tubo cónico con medio de selección espermática con una inclinación de 45° durante 1 h a 38-39 °C.

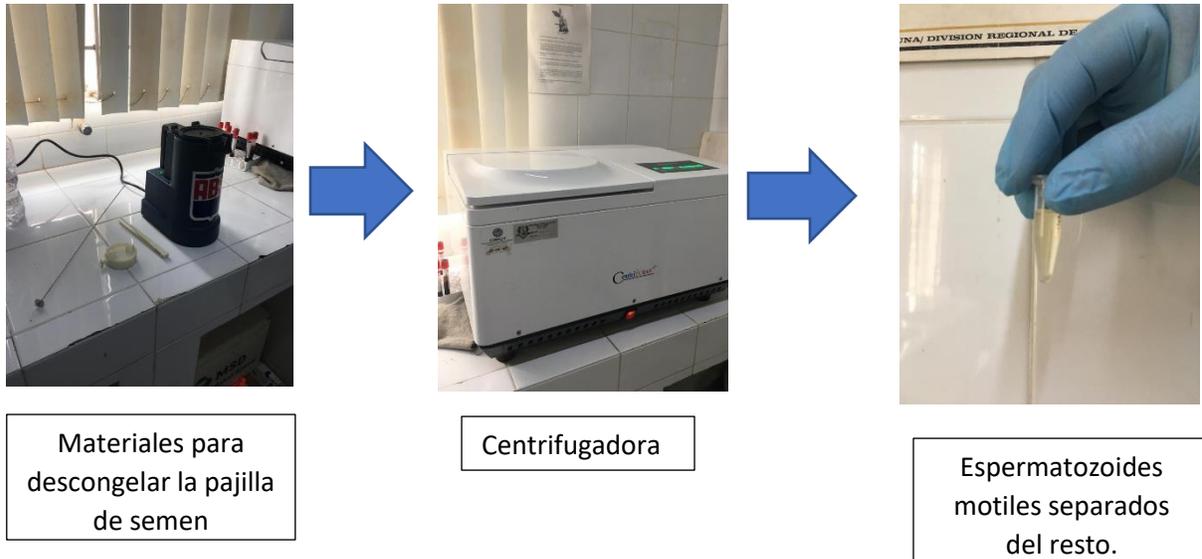
Pone a prueba la capacidad de los espermatozoides para migrar con movimientos propios.

Transcurrida la hora, los espermatozoides desplazados a la parte superior son los de mejor condición (Magdanz et al., 2019)

Gradientes de densidad.

Se utiliza la sedimentación-centrifugación para los espermatozoides motiles y viables. Los espermatozoides de mejor calidad y mayor movilidad llegarán al fondo del tubo, es decir, atravesar todos los medios a pesar de la densidad y estos son los que se usaran para la fertilización (Salgado *et al.*, 2020).

Esquema 3 Proceso de capacitación espermática



(CBR, 2023)

Capacitación espermática.

Realiza cambios estructurales en el espermatozoide, con el uso de «capacitantes» para ayudar a la penetración y fusión al ovocito.

La capacitación favorece cambios como: eliminación de componentes adheridos a la membrana del espermatozoide, cambio de la composición lipídica de la membrana espermática, aumento de la permeabilidad a los iones Ca^{2+} , cambio en el pH interno, incremento en la permeabilidad (Salgado *et al.*, 2020).

Los inductores más comunes in vitro son:

- ✓ Células del cumulus
- ✓ El Medio Tyrode's libre de calcio.

- ✓ La albumina sérica bovina (BSA)
- ✓ La heparina.
- ✓ Los aminoácidos y catecolaminas.
- ✓ La cafeína.

(Salgado *et al.*, 2020).

Terminando la capacitación se define la dosis de espermatozoides para cultivar con los ovocitos maduros. El conteo se realiza con hemocitómetro o cámara de Thoma (Salgado *et al.*, 2020).

La dosis va de 1 a 6×10^6 espermatozoides/ml de medio de fecundación, dependiendo del protocolo utilizado (Mohanty *et al.*, 2018).

Fecundación *In Vitro*:

Preparada una caja Petri con semen previamente capacitado y con la concentración adecuada, se preparan las gotas para la inseminación, cubiertas con aceite mineral.

Se sacan los ovocitos de la estufa y se colocan por grupos en las gotas de semen, en proporción de 10 ovocitos en 100 μ l. Se incuba en la estufa los ovocitos y el semen durante 24 horas (Filipiak *et al.*, 2010).

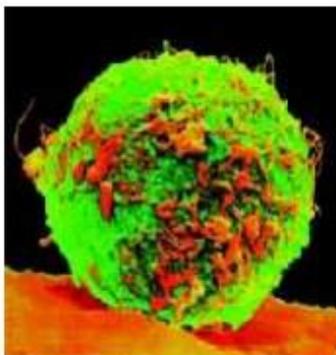


Foto 10: Ovocito siendo fecundado por espermatozoides



Fotos 11 y 12: Ovocitos penetrados por un espermatozoide

Ilustración 4 Ovocitos siendo fecundados.

Los medios para el desarrollo de la fertilización in vitro son similares a la maduración in vitro, pudiendo ser abiertos o bajo aceite mineral, usándose más recubierto y en gotas (Aravina et al., 2019).

Para la fertilización in vitro se utilizan medios como el TALP, el TCM-199 o el SOF, pudiéndose ser suplementadas con varios componentes (Ferre et al., 2020)

3.7 Cultivo.

En esta etapa los ovocitos fertilizados se exponen a nutrientes y sustancias que apoyan la división celular y el crecimiento embrionario, se desarrollan hasta un estadio embrionario apto para la transferencia a la receptora (Gonella et al., 2013).

Se define como el tiempo en el cual el cigoto se convierte en blastocito. Abarca desde el día 1 hasta el 7 pos fertilización.

Se puede desarrollar:

- a) soporte (placa de Petri, placa de cuatro pozos, en gotas), con o sin cobertura de aceite mineral
- b) medio (medio simple definido, semi-definido indefinido, medios condicionados)
- c) tipos de células (cocultivo) (Salgado et al, 2020).

Medios de cultivo.

Es fundamental, ya que proporciona el medio ideal para el desarrollo del embrión. El más usado es el fluido oviductal sintético (SOF), dado que asemeja las condiciones fisiológicas (Salgado et al, 2020).

Calidad embrionaria.

Transcurrida la fertilización, los cigotos se retiran del medio de FIV. Lo primero es retirar las células de cumulus adyacentes para clasificarlas (Salgado et al, 2020).

La remoción se realiza con pipeteo fino, con el uso de hialuronidasa; hidrolizando el ácido hialurónico que rodea el ovulo, o a través de agitación (Salgado et al, 2020).

La clasificación de los cigotos se realizó de acuerdo con la clasificación ovocitaria para citoplasma, con el objetivo de eliminar estructuras en estado de apoptosis (Salgado *et al*, 2020).

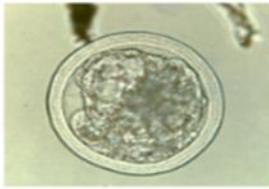
La tensión de oxígeno en mamíferos es de 3.5 a 8 % en el tracto reproductivo, debido a esto el cultivo in vitro debe usar una tensión de oxígeno similar (Gonella., 2013).

Finalmente, los cigotos de mayor calidad pasan a ser cultivados (Salgado *et al*, 2020).

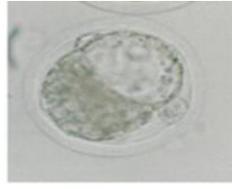
La evaluación de la calidad embrionaria es punto importante para comprender la eficiencia en la producción embrionaria. Se realiza al día 2 o 3 (estadios de 2-4 o más células) conocida como clivaje al día 5 o 6 (morulas o morulas compactas) denominado previsión y al día 7 (blastocito) o desarrollo embrionario con el fin de seleccionar los embriones con mejor calidad (Salgado *et al*, 2020).

La morfología del embrión nos refleja la calidad de este, calificando su apariencia y estadio de desarrollo (Rocha *et al.*, 2016).

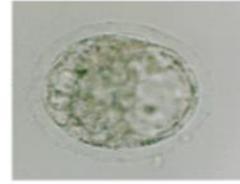
La simetría, la homogeneidad y la coloración de la estructura del embrión, al igual que el tiempo de desarrollo van a definir las tasas preñes y sensibilidad al momento de la transferencia (Salgado *et al*, 2020).



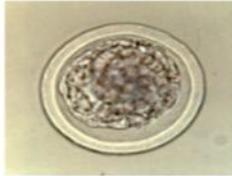
Cycle Day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 2



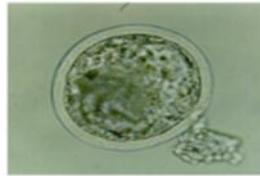
Cycle Day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 1



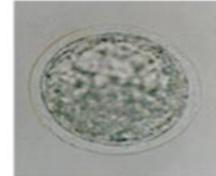
Cycle Day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 2



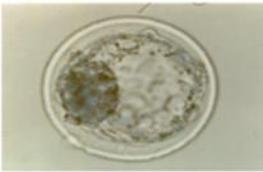
Cycle Day: 7.5
Stage Code: 5
Quality Code: 1



Cycle Day: 7.5
Stage Code: 6
Quality Code: 1



Cycle Day: 7.5
Stage Code: 6
Quality Code: 1



Cycle Day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1



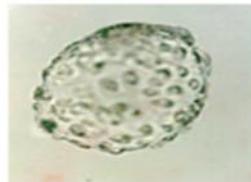
Cycle Day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 2



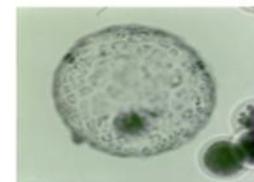
Cycle Day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 2



Cycle Day: 8
Stage Code: 8
Quality Code: 1



Cycle Day: 8
Stage Code: 8
Quality Code: 1



Cycle Day: 9
Stage Code: 9
Quality Code: 1

(Gabriel Bo)

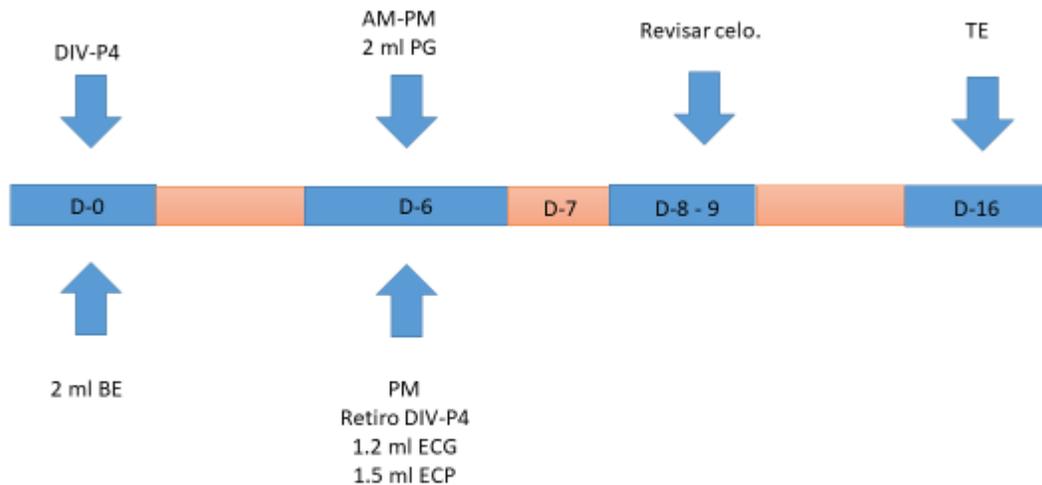
Ilustración 5 Embriones en diferentes etapas.

3.8 Preparación de la receptora de embrión y transferencia del mismo.

La sincronización del momento del ciclo de la receptora y el estadio del embrión nos garantiza un índice de éxito más alto de la transferencia (Ponce *et al.*, 2015).

La sincronización comienza con la colocación de un dispositivo CIDR el día 0 junto a un GnRH, y una vez pasados 7 días se retira y se administra un PGF. Tras 48 horas se aplica un GnRH y 7 días después la vaca esta lista para transferirle el embrión (Ponce *et al.*, 2015).

Tabla 2 Sincronización de receptoras de embriones.



Transferencia del embrión.

Se recomienda utilizar anestesia epidural en la hembra receptora si está nerviosa (Ponce *et al.*, 2015).

Se debe llenar una bitácora en el laboratorio con el nombre del toro, vaca donadora y vaca receptora (Ponce *et al.*, 2015).

Al detectar la vaca receptora en celo se lleva a la manga para ser ecografiada para descubrir en cual ovario está presente el cuerpo lúteo (C.L.), ya que el embrión será depositado en el cuerno del mismo lado al ovario donde encontremos un cuerpo lúteo (Ponce *et al.*, 2015).

Se debe lavar la zona perineal para poder introducir la pistola de transferencia que contiene el embrión y debe ser llevado hasta el cuerno donde está presente el cuerpo lúteo y se deposita el embrión en la curvatura (Ponce, 2015).



(Robertson, 2015)

Ilustración 6 Sitio donde se deposita el embrión.

3.9 Criopreservación del embrión.

El objetivo es lograr almacenar el embrión en bajas temperaturas (-196°) conservando su integridad removiendo el agua antes de su congelamiento, evitando la formación de hielo (Garcia et al, 2014).

Los métodos de crio preservación más común son de congelación convencional y el de vitrificación.

Congelación convencional.

Este método es el más antiguo y el más usado actualmente (Vajta 2000).

Utiliza una curva de congelación lenta, equilibrando factores que causan daño celular como: formación de cristales de hielo, fractura del embrión, daño toxico y osmótico (Rodríguez *et al.*, 2011).

Consiste en equilibrar los embriones en pajillas de inseminación de 0,25 ml equilibrados con crio protectores, con tasas de enfriamiento entre 0,3 y 1°C/min,

hasta alcanzar los -30 a -35°C , para luego sumergirlos en el nitrógeno líquido (Rodríguez *et al.*, 2011).

Vitrificación.

En este método ocurre la gelificación de un líquido, elevando la viscosidad durante el enfriamiento eliminando la formación de hielo en la célula (Rodríguez *et al.*, 2011).

La curva de enfriamiento es más rápida ($\approx 2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$) utilizando crio protectores más concentrados permitiendo la formación del “estado vítreo”, que disminuye los daños químicos (Rodríguez *et al.*, 2011).

IV. Conclusiones.

Esta biotecnología es una herramienta que contribuye a los sistemas ganaderos beneficiando el mejoramiento genético y al estudio del desarrollo embrionario aumentando la productividad de animales sobresalientes en características económicamente importantes

Esta técnica abarca a nivel de campo la recolección de ovocitos en la vaca donadora, y la transferencia del embrión producido fresco o congelado a la receptora, mientras que en el laboratorio se realiza la maduración, fertilización y crio preservación de los embriones de hembras donantes, para posteriormente transferirlos a hembras receptoras que no transmitirán ninguna característica genética a la cría, sirviendo solamente para mantenerlo al parto y durante la lactancia.

Cada fase es importante ya que comprenden una serie de procesos fisiológicos que son condicionados para ser el éxito o el fracaso de la fase siguiente.

V. Recomendaciones.

Es vital contar con el laboratorio, equipo y protocolos adecuados que garanticen la simulación de las condiciones naturales del desarrollo de los embriones en la madre.

Las vacas donadoras como receptoras deben cumplir todos los criterios establecidos para lograr un buen resultado.

VI. Literatura citada.

- Acevedo, L., J., (2016). Manual de Procedimientos de producción in vivo de embriones bovinos. Pág. 20.
- Acosta, T., J., Álvarez, R., D., Giménez F., D., Domínguez R., A., Britos, A. (2020). Manual de transferencia de embriones. Pág. 6-10.
- Albeiro, R. (2001). Manejo de donantes y receptoras. Biotecnología De La Reproducción. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. Pág. 21-26.
- Albeiro, R. (2020). Manual de transferencia de embriones. INTA-Buenos Aires Argentina. Pág. 1–31.
- Aravina, M., Diers S., Knorr C., Tetens J., Blaschka C. (2019). Effects of an oil covered culture system on bovine in vitro produced embryos. In: Proc 35th Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE). Murcia, Spain.
- Bo, Gabriel., Evaluación y clasificación de embriones bovinos.
- Carballo, G., D., Tríbulo A., Tríbulo R., Tríbulo H. y Bó G., A. (2010). Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four after progesterone and estradiol administration. *Reprod Fertil Dev.* 22:358.
- Cardona, Á. P. L., Morales, N. A. G., Morales, A. M. T., & Ángel, M. O. (2014). Procedimientos para producción embriones bovinos in vitro. *Fondo Editorial Biogénesis*, 109-138.
- Colazo, M. G., y Mapletoff, R. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos.
- Camargo, E., S., C., Barón, E., M., P. (2012). Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina: revisión. *Revista Ciencia y Agricultura*, 9(2), 29-37.
- Centro de biotecnología de la reproducción de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 2023.
- Crespo, J., L., Guamán, E., G. (2015). Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion.
- De León-García, R., H., González, R., A., Guerra, P., Flores, K. (2021). EFECTO DEL MÉTODO DE CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA BOVINA SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y TASA DE FERTILIZACIÓN in vitro. *Ciencia Agropecuaria*, (33), 64-75.
- Delgado, T., G., A. (2018). Efecto de tres niveles de oxígeno en la atmósfera de cultivo y la adición de un antioxidante comercial en el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro. *Acta universitaria*, 28(2), 53-57.

Espin, V., P., S. (2018). Maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes (Bachelor's thesis).

Fernández, F., J., Hernández., Reyes, M. (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.

Fernández, A., Díaz, T., Muñoz, G. (2007). Producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(1), 51-60.

Ferré, L., B., Kjelland, M., E., Strøbech, L., B., Hyttel, P., Mermillod, P., Ross, P., J. (2020). Avances recientes en la producción de embriones in vitro bovinos: historia y métodos de la biotecnología reproductiva. *Animal* , 14 (5), 991-1004.

Filipiak, Y., Larocca, C. (2010). Manual de fertilización in vitro en bovinos. Facultad de Veterinaria–Universidad de la República Montevideo, República Oriental del Uruguay.

García, I., V. (2020). Efecto de la bipartición y del método de criopreservación en el desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro.

García, G., M., V., Montenegro T., L., F. (2014). *Evaluación de la crioconservación de embriones bovinos (Bos taurus) por dos métodos de descenso de temperatura en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi* (Bachelor's thesis, LATACUNGA/UTC/2014).

Goicochea V., J., Rondón J., W., Acosta P., F., Gómez M., Y., Montalvo M., M., Salvatierra A., M., Fuster, M., R. (2021). Efecto de dos medios de fertilización en el desarrollo in vitro de embriones bovinos criollos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5).

Gonella D., Á., M., Atuesta, B., J., E., Bernal, U., S., M., Chacón, J., L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro.

Irouleguy, J., M., (2011) Transferencia de embriones a tiempo fijo: Algunas variables que afectan la tasa de preñez FCV, Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires.

Lino, A., A., Chasi, B., E. (2021). Efecto de dos medios de maduración sobre la producción de embriones partenogénéticos en bovinos.

Magdanz, V., Boryshpolets, S., Ridzewski, C., Eckel, B., Reinhardt, K. (2019). The motility-based swim-up technique separates bull sperm based on differences in metabolic rates and tail length.

Mapletoft, R., J., 2013, Historia y perspectivas de la transferencia de embriones. *Animación Reprod.*, v.10, n.3, p.168-173.

Mohanty, T.,K., Lone, S.,A., Kumaresan, A., Bhakat, M., Kumar, R., Baithalu, R.,K., Mohanty, A.,K. (2018). Sperm dosage and site of insemination in relation to fertility in bovines. *Asian Pacific J Reprod* 7: 1- 5.

Murillo, D., S., Matute, J., M. (2021). Efecto de dos concentraciones de O₂ en la producción in vitro de embriones bovinos.

Nathalia, G. (2014). Transferencia de embriones: vacas donadoras y receptoras. (p.1) jalisco gobierno del estado.

Orellana, J., C., Peralta, E., M. (2007). Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies.

Ponce, K. L., Rosero, K., M. (2020). Efecto de la suplementación con cafeína en el medio de fertilización sobre la producción in vitro de embriones bovinos.

Ponce, N. (2015). Transferencia de embriones en ganado bovino. *U. C. Herrera, Ed, 42.*

Ramirez, O., J., A. (2020). Formación en producción in vitro de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia.

Rivera, V., W., R. (2022). Efecto de la somatotropina en diferentes niveles sobre la calidad y cantidad de estructuras colectadas en vacas Brahman Superovuladas a tiempo fijo en el cantón Bucay provincia de Guayas.

Rocha, J., C., Passalia, F., Matos, F.,D., Maserati, M.,P., Alves, M.,F., Almeida, T.,G., Cardoso, B.,L. (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: ¿How far we are from the gold standard? *JBRA Assist Reprod* 20: 150-158.

Rodríguez, P., Jiménez, C. (2011). Criopreservación de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 58(2), 107-119.

Salgado-Cruz, E., Lopera-Vásquez, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3).

Solís, C., A., Armas, R., Morales, J., Ferrante, M., Denis G., R. (2020). PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES EN NOVILLAS FELCKVIEH BAJO CONDICIONES TROPICALES IN VITRO EMBRYO PRODUCTION IN FLECKVIEH HEIFERS UNDER TROPICAL CLIMATE.

Zambonino, B., G., E. (2014). Manual de crioconservación de embriones de mamíferos domésticos en el laboratorio de la biotecnología de reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi (Bachelor's thesis, LATACUNGA/UTC/2014).