



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES EN BOVINO

Por:

GERMAN RAZIEEL ORZUNA OLIVAN

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Saltillo, Coahuila, México

Mayo 2015



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Presentado por:

GERMAN RAZIEEL ORZUNA OLIVAN

MONOGRAFÍA

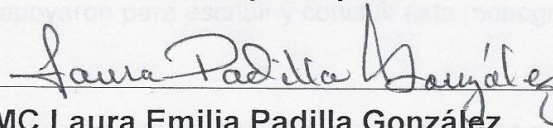
PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES EN BOVINO

Que somete a consideración del H. Jurado examinador como requisito
parcial para obtener el Título de:

INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

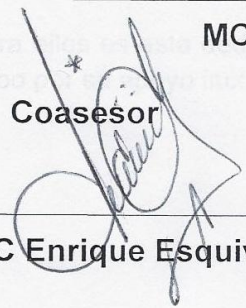
APROBADA

Asesora principal



MC Laura Emilia Padilla González

Coasesor


MC Enrique Esquivel Gutiérrez

Coasesor


MC Pedro Carrillo Lopez


Dr José Duñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal

Saltillo, Coahuila, México

Mayo 2015





Dedicatorias

A mis padre y hermanos quienes me apoyaron todo el tiempo.

A mi novia Lorena quien me apoyo y alentó para continuar, cuando parecía que me iba a rendir.

A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, aun sin importar que muchas veces no ponía atención en clase, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí.

A los sinodales quienes estudiaron mi monografía y la aprobaron.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta monografía.

Para ellos es esta dedicatoria de monografía, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.



ÍNDICE DEL CONTENIDO

I. INTRODUCCION

OBJETIVOS

II. REVISION DE LITERATURA

1. RESEÑA HISTORICA

2. PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS

2.1. Métodos empleados para la obtención de ovocitos

2.1.1. Recolección y transporte de ovarios

2.1.2. Técnica de aspiración folicular (Ovum Pick-Up; OPU)

2.2. Sistemas de producción in vitro

2.2.1. Maduración de ovocitos

2.2.2. Fecundación de ovocitos

2.2.3. Cultivo de embriones

2.3. Componentes de los medios de cultivo

2.3.1. Parámetros biofísicos y elementos orgánicos

2.3.2. Compuestos orgánicos

2.4. Ventajas y Desventajas de la producción de embriones in vitro (PIV)



3. METODOS DE CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS

3.1. Congelación

3.2. Vitrificación

4. EVALUACION DE EMBRIONES BOVINOS

4.1. Clasificación y Estadío de desarrollo embrionario

4.2. Calidad embrionaria

5. PROTOCOLO DE LA PRODUCCION IN VITRO (PIV) DE EMBRIONES

5.1. Procedimiento para la obtención y maduración de ovocitos

5.2. Metodología de fecundación in vitro de embriones bovinos

5.3. Metodología para el cultivo in vitro de embriones bovinos

5.4. Descongelación de embriones

5.5. Transferencia de embriones

III. CONCLUSIONES

IV. LITERATURA CITADA

V. ANEXOS



ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen

páginas

1. Folículos localizados ecográficamente.....	7
2. Prensa de contención.....	8
3. Anestesia epidural.....	9
4. Limpieza del área de trabajo.....	9
5. Introducción del transductor. Sujeción del ovario (mano izquierda) y manejo del mango de OPU (mano derecha).....	10
6. Filtración del fluido obtenido.....	11
7. Búsqueda y clasificación de los óvulos.....	12
8. Ovocitos rodeados de 6 capas de células del cúmulus.....	12
9. Ovocitos rodeados de 2 capas de células de cúmulus.....	13
10. Ovocitos con pocas células de cúmulus.....	13



11. Ovocitos desnudos.....	14
12. Ovocito con cúmulus expandido con 24h de maduración.....	14
13. Termo de transporte de ovarios.....	46
14. Acondicionamiento de los ovarios.....	47
15. Ovarios luego de lavado.....	47
16. Bomba de vacío para la aspiración de ovocitos.....	48
17. Aspiración de ovocitos.....	48
18. Extracción del pellet y caja de búsqueda.....	49
19. Lavado y selección de ovocitos.....	50
20. Cajas de cultivo. Compuestas de 4 pozos cargadas con medio de maduración.....	50
21. Estufa de cultivo con control de temperatura y CO₂ utilizada para maduración y fecundación de ovocitos.....	51
22. Termo conteniendo semen en N₂ líquido.....	54
23. Baño María utilizado para la descongelación de semen.....	55
24. Cámara de Neubauer.....	56



25. Tubo con Percoll al 90 y 45% y semen descongelado.....	58
26. Agitación en vortex. Útil para la eliminación de las células de la granulosa.....	62
27. Uso de micropipeta.....	62
28. Cigotos luego del desempaque.....	63



ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico

páginas

1. Sistema de aspiración folicular (OPU).....	10
2. Esquema de la PIV.....	15
3. Envase de los embriones para congelación.....	34
4. Identificación de la pajuela.....	37
5. Protocolo general de congelación de embriones.....	38
6. Envasado de los embriones para vitrificación.....	40
7. Técnica Open Pulled Straw (OPS).....	42
8. Clasificación de los embriones según normas IETS.....	43
9. Esquema PIV desde la obtención de ovocitos hasta su maduración...51	
10. Esquema PIV para la fecundación.....	57
11. Técnica de centrifugación en Percoll,	59



12. Estados embrionarios en periodo de cultivo.....65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

páginas

1. Composición del medio de congelación.....	36
2. Solución 1 para vitrificación de embriones mediante protocolo OPS.....	41
3. Solución 2 para vitrificación protocolo OPS.....	41
4. Valoración morfológica según IETS.....	44
5. Formulación final del medio de capacitación.....	46
6. Medio de fecundación IVF-SOF (50ml).....	53
7. Medio de fecundación (FIV).....	54
8. Formulación final del medio de fecundación.....	52
9. Dilución de heparina para la fecundación.....	52



10. Medio de cultivo CR1 Stock para cultivo de embriones.....	61
11. Formulación final del medio de cultivo CR1 suplementado con 3 mg/ml de BSA y aminoácidos(AA).....	61

iii

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo páginas

1. Localización fisiológica de los embriones en el útero.....	75
2. Sitio donde se produce la obtención de los ovocitos (día 1).....	75
3. Lugar donde en condiciones normales se realizaría la fecundación.....	76
4. Secuencia de cambios en los embriones que se imitan en el laboratorio..	76

iiii



RESUMEN

Las técnicas para producir embriones bovinos, mediante la maduración de ovocitos y su posterior fertilización in vitro, ofrece la posibilidad de obtener embriones a bajo costo para ser utilizados con fines de estudio o con propósitos comerciales. Los embriones se producen a partir de óvulos recuperados de ovarios provenientes de animales sacrificados en el rastro. Los ovarios son transportados al laboratorio donde se procede a su lavado, acondicionamiento y aspiración de los folículos, para posteriormente seleccionar los ovocitos más óptimos y colocarlos en medios especiales de maduración, luego serán fecundados con semen elegido por el productor y cultivados en estufas en condiciones atmosféricas especiales durante 7-8 días. Finalizado este periodo los embriones están en condiciones de ser transferidos en fresco a una vaca elegida para este fin o criopreservarlos en termos de nitrógeno líquido hasta su transferencia en el momento apropiado.

Palabras claves: Embrión bovino , maduración, fertilización, cultivo, criopreservación, transferencia.

Correo electrónico:

German Razieel Orzuna olivan: razielorzuna@hotmail.com



I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo es una selección de información que busca despertar el interés sobre la técnica de producción de embriones bovinos *in vitro*, adquiriendo los conocimientos básicos para que en el futuro se difundan ampliamente y se aplique como una herramienta de mejora genética.

La biotecnología de la reproducción ha experimentado un gran avance en las últimas décadas y ha aportado a la ciencia nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados: los mamíferos; así el desarrollo de nuevas biotecnologías para producir animales transgénicos o para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones.

La producción *in vitro* de embriones bovinos ha demostrado ser una tecnología reproductiva con una positiva relación costo-beneficio. En la última década del siglo pasado, se caracterizó por ser un período relevante para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. Así mismo, en la actualidad se vive la era de la clonación y transgénesis, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas. Cuando son transferidos a hembras receptoras, obteniendo el nacimiento de crías saludables y genéticamente superiores.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL



El objetivo general de esta monografía es dar a conocer y difundir la técnica de Producción *In Vitro* de Embriones Bovinos, buscando que el estudiante o interesado despierte un profundo interés en el proceso y adquiera las bases necesarias para esta área de la investigación

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dar a conocer los métodos de obtención de ovocitos en bovinos
- Conocer la técnica *in vitro* para obtener embriones bovinos.
- Señalar los principales medios de cultivo para la producción *in vitro* de embriones.
- Adquirir el conocimiento sobre los principales métodos de criopreservación de embriones bovinos.



II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. RESEÑA HISTÓRICA

La transferencia comercial de embriones en Norteamérica se desarrolló en los principios de los años setenta con la introducción de razas continentales (Betteridge, 1981; Betteridge, 2003). En los últimos 30 años la aplicación de esta tecnología ha ido en aumento (especialmente en el ganado lechero), con más animales seleccionados por su genética que por un fenotipo deseable (Smith, 1988; Gibson y Smith, 1989). La historia de la transferencia de embriones en el ganado bovino fue publicada por Seidel en 1991 en una publicación de la FAO.

El primer trabajo experimental sobre la embriología de mamíferos se llevó a cabo con conejos, a la vista de sus características biológicas favorables, tales como el tamaño relativamente grande del huevo, lo que facilita la manipulación, así como la ovulación inducida por el apareamiento.

Sólo a principios del siglo XX, junto con el desarrollo de la química, que permitió a los medios de cultivo y desarrollo de una mejor calidad, la embriología ha experimentado avances significativos, con profundas consecuencias en el éxito de la recolección y el cultivo de embriones.

Por último, en los años 50, Whitten propuso una nueva formulación de los medios de cultivo que se utiliza tanto en la recolección y cultivo de embriones aumentando significativamente el número de embriones implantados con éxito.

Así mismo, se ha desarrollado un medio con bicarbonato de Krebs-Ringer, suplementado con albúmina de suero bovino que fue capaz de promover la



división de un embrión de ratón con una célula a la fase de blastocisto; por otro lado Brinster comenzó una línea de investigación para determinar las necesidades nutricionales y desarrolló la técnica de cultivo de embriones en microgotas la cual se utiliza actualmente en varios laboratorios en el mundo tanto en animales y humanos.

Estas nuevas condiciones de cultivo, aunque muy simple, permite la expansión del desarrollo de técnicas para la producción de embriones *in vitro* (Chang, 1959).

Se tiene reporte del primer nacimiento de un mamífero (conejo) generado a partir de esta técnica. Desde entonces y hasta finales de los 70, hubo informes de nacimientos de crías saludables por fertilización *in vitro* (FIV) que registró el informe de Chang (1959).

Whittingham, en 1968, trabajando con ratones tuvo éxito bajo este esquema, y algunos años más tarde Toyoda y Chang establecieron la fertilización *in vitro* (FIV) en ratas. Steptoe y Edwards (1978) establecieron en la historia de la fecundación *in vitro* a nivel mundial el éxito del primer bebé humano.

Con respecto a la ganadería, sólo en los años 70 que vinieron los primeros informes de nacimiento con éxito después de la maduración *in vitro* seguida de la fertilización de embriones para la transferencia *in vivo*.

Hasta entonces, al parecer, no había un informe de la producción de animales jóvenes nacidos después de la fecundación *in vitro* (FIV). A pesar de que la transferencia de embriones producidos *in vivo* en el ganado ha sido ampliamente utilizada durante 70 años, los esfuerzos para producir embriones bovinos *in vitro* fueron considerados por Blandau (1980) como un "fracaso total".



Sin embargo, incluso con las pruebas presentadas por Blandau (1980) a principios de los años 80 se produjo finalmente un becerro de la fertilización *in vitro* (FIV). Brackett y col. (1982) fueron los primeros en publicar el nacimiento de un ternero saludable, lo cual ocurrió en 1981 por fertilización *in vitro*. En su investigación se utilizaron 22 donantes y 7 receptoras, para la fertilización se utilizaron tanto semen fresco como muestras congeladas. Las muestras de semen de los animales fueron pre seleccionados para la inseminación artificial, lo que indica una buena calidad de los espermatozoides.

La colección de ovocitos se realizó por cirugía, y 177 ovocitos se recuperaron de los cuales 52% fertilizaron. A pesar del gran número de embriones producidos solo se logró gestar en una sola donante, que recibió un embrión en la fase de 4 células.

La primera ternera por fertilización *in vitro* (FIV) nació pesando 45 kg y después de unos meses de observaciones, no se vieron cambios en el desarrollo y el comportamiento del animal. Desde entonces, reciben un gran impulso, ya que se comprobó que podía ser plenamente viable la producción de embriones en condiciones artificiales (Giannotti, 2011).

2. PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.

2.1. MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS

2.1.1. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE OVARIOS

Para esta recolección se utilizan ovarios a partir de hembras sacrificadas en el rastro, para llevar acabo la aspiración de los folículos los cuales deben tener un



diámetro comprendido entre 3 y 6 mm (Herradón y col., 2007); así mismo se pueden obtener de vacas castradas (INTA, 2004).

Esta técnica suministra una fuente abundante de ovocitos a bajo costo, con una estimación de 10 ovocitos por ovario, con características de animales en diferentes estados de ciclo estral que pueden ser madurados, criopreservados, fertilizados y cultivados *in vitro* hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario (Hincapié, 2010).

Con este método se aprovechan hembras sacrificadas por motivos sanitarios, accidentes o reposición (Díez y col., 2011).

Los ovocitos son en general obtenidos a partir de ovarios de vacas y vaquillonas no preñadas aunque hasta el momento no existe evidencia que la producción de ovocitos a partir de ovarios con un cuerpo lúteo de gestación sea diferente. Los ovarios contienen un gran número de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo.

El transporte de los ovarios se lleva a cabo en un termo que contiene una solución salina con antibiótico a temperatura ambiente pudiéndose conservar entre 22-24 °C durante 2-5 horas sin que afecte la capacidad de desarrollo posterior. A su llegada en el laboratorio se enjuagan con etanol al 70%, este procedimiento se realiza dos veces con solución salina. Posteriormente se colocan en esta misma solución a 35-37°C en una jarra plástica sobre una platina caliente y se procede a la aspiración de los ovocitos (Garde y col., 2011).

2.1.2. TÉCNICA DE ASPIRACIÓN FOLICULAR (Ovum Pick-Up; OPU)

La adquisición de ovocitos disponibles para la producción de embriones *in vitro* (PIV) se produce a través de la técnica de aspiración folicular transvaginal OPU



(ovum pick up). Hace más de una década la OPU ha mejorado la opción para la recuperación de ovocitos *in vivo* en la especie bovina (Imagen 1) (Celestinos y Gatica, 2002), y su posterior maduración, fecundación y cultivo *in vitro* permite la producción de embriones que pueden ser criopreservados o bien transferidos a hembras receptoras (Díez y col., 2011).



Imagen 1. Folículos localizados ecográficamente.

(Fuente: Ruiz, 2006)

Esta técnica permite obtener ovocitos en las hembras de más de seis meses de edad, durante los primeros tres meses de gestación y a partir de la 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de seis meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia (Herradón y col., 2007).

La recolección de ovocitos de animales vivos permite incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora al año, obtenidos por procedimientos *in vitro*, además permite la disminución del intervalo generacional y ayuda a establecer esquemas que logren incrementar la eficiencia productiva.

La aspiración transvaginal guiada por ultrasonido es la técnica de recolección de ovocitos de hembras vivas usada regularmente. La aspiración folicular puede ser repetida en el mismo animal durante 5-6 meses con un intervalo de dos



aspiraciones por semana o una semanal, sin ningún efecto sobre la reproducción o el bienestar animal.

Además la aspiración folicular (OPU) se puede aplicar durante los primeros tres meses de gestación a novillas o vacas y a novillonas pre púberes con lo que se logra hacer más corto el intervalo generacional. La aspiración folicular (OPU) y fertilización *in vitro* (FIV) permiten obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad o mala respuesta a los tratamientos superovulatorios. Se ha demostrado que al final del periodo de aspiraciones los animales pueden retornar a sus ciclos estrales normales y ser incorporados a sus programas de cría. La viabilidad de los embriones producidos a partir de los ovocitos obtenidos por aspiración es similar a la alcanzada por embriones producidos por otros procedimientos *in vitro*, pero un poco más baja que la de embriones obtenidos por lavado, resultando porcentajes de preñez que varían desde un 25-45 % (Hincapié, 2010).

Los pasos para la aspiración folicular (OPU) se puede resumir de la siguiente manera:

1. En la aspiración folicular (OPU) se requiere una tranquilización previa de la hembra, esta se lleva a cabo con el animal en pie en una prensa (Imagen 2), mediante un anestésico a base de xilacina (i.m.) al 2%.



Imagen 2. Prensa de contención.

(Fuente: Serizier, 2011)



2. Posteriormente, se debe administrar anestesia vía epidural (Imagen 3), para reducir los esfuerzos expulsivos y facilitar la manipulación del ovario.

3. Vaciamiento del recto, limpieza y desinfección de la vulva y área perineal (Imagen 4)



Imagen 3. Anestesia epidural.

(Fuente: Serizier, 2011)

4. Se introducirá el transductor en la vagina (Imagen 5) convenientemente lubricado y protegido por una cubierta sanitaria de látex para realizar la aspiración folicular.

Para la visualización de los folículos ováricos se emplea un ecógrafo equipado con una sonda transvaginal de 5-7.5 MHz y un “handgrip” o mango de OPU de 60 cm de longitud donde se colocará la guía de punción. Por la guía se introducirá una aguja de punción desechable (20 G, 0.9 x 70mm) conectada a un tubo estéril de 50 ml mediante una conducción de teflón. El equipo de OPU se completa con una bomba de vacío accionada por pedal con la que se aplicó una aspiración constante de 50-53 mm Hg (20 ml/min). El tubo de recolecta debe mantenerse atemperado a 37°C en baño termostático (Grafico 1).



Imagen 4. Limpieza del área de trabajo.
(Fuente: Serizier. 2011)



Imagen 5. Introducción del transductor. Sujeción del ovario (mano izquierda) y manejo del mango de OPU (mano derecha) (Fuente: Serizier, 2011).

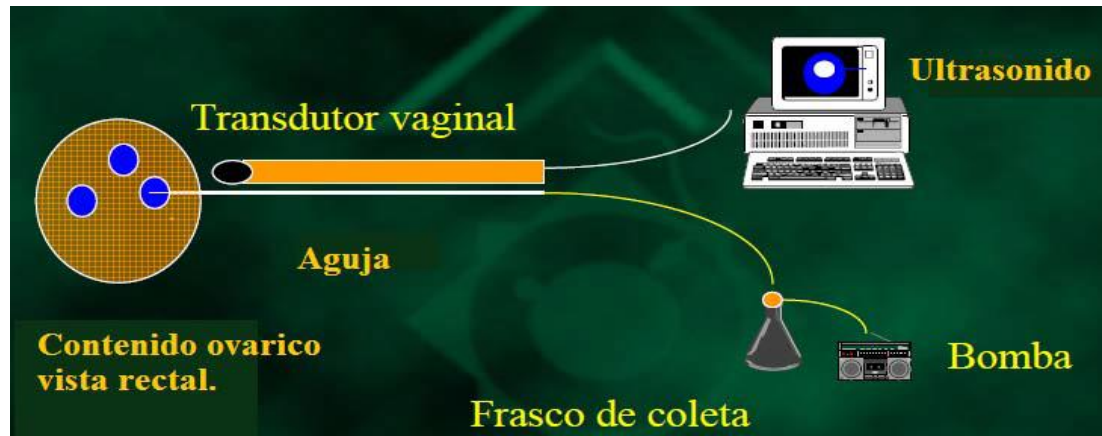


Grafico 1. Sistema de aspiración folicular (OPU).

(Fuente: Serizier, 2011)

5. Los ovarios se posicionarán vía rectal delante de la sonda para folículos visibles de más de 3 mm de diámetro. Antes de iniciar la sesión de punción se drenará del sistema aspirando una pequeña cantidad de medio de recolección. Tras la aspiración de cada 3-4 folículos se realizará un lavado exhaustivo del fluido folicular en la aguja de aspiración y en el sistema con medio de recolección [PBS suplementado con heparina sódica (2'2 UI/ml) y suero fetal bovino (1%)].

6. El fluido obtenido de cada animal contenido en un tubo de 50 ml será inmediatamente filtrado (Imagen 6) los restos de sangre serán eliminados por continuos lavados en suero fetal bovino (PBS) fresco y pasarlos a una caja Petri para localizar y evaluar morfológicamente los complejos cumulus-ovocito (COCs) aspirados, todo esto bajo estereomicroscopio (Ruiz, 2006) (Imagen 7).





Imagen 6. Filtración del fluido obtenido(Fuente: Serizier, 2011)



Imagen

Búsqueda y clasificación de los óvulos(Fuente: CNRG, 2014).

Posteriormente se clasifican los ovocitos obtenidos en cinco categorías, según homogeneidad, morfología del citoplasma y compactibilidad de las células del cumulo (Ruíz, 2006).

- **Categoría I:** Ovocitos con más de tres capas de células de cumulo compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granuloso (Imagen 8).

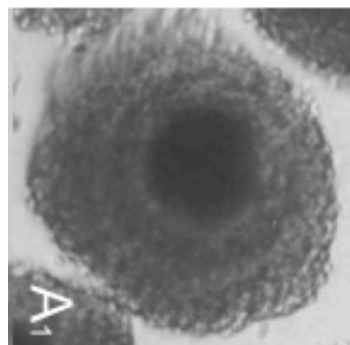


Imagen 8. Ovocitos rodeados de 6 capas de células del cúmulo.

(Fuente: CNRG, 2014)



- **Categoría II:** Ovocitos con menos de tres capas de células del cumulo y citoplasma generalmente homogéneo (Imagen 9).

- **Categoría III:** Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras (Imagen 10).

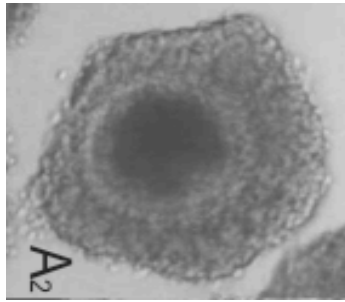


Imagen 9. Ovocitos rodeados de 2 capas de células de cúmulus.

(Fuente: CNRG, 2014)

- **Categoría III:** Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras (Imagen 10).

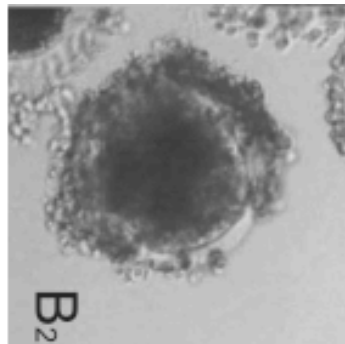


Imagen 10. Ovocitos con pocas células de cúmulus.

(Fuente: CNRG, 2014)

- **Categoría IV:** Ovocitos desnudados (Imagen 11).

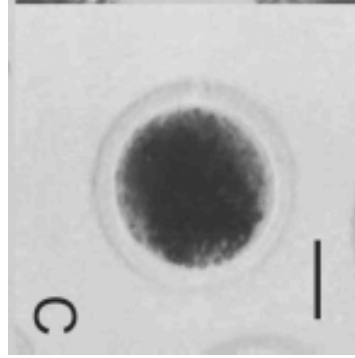


Imagen 11. Ovocitos desnudos.

(Fuente: CNRG, 2014)

- **Categoría V:** Ovocitos maduros con cumulo expandido (Imagen 12).

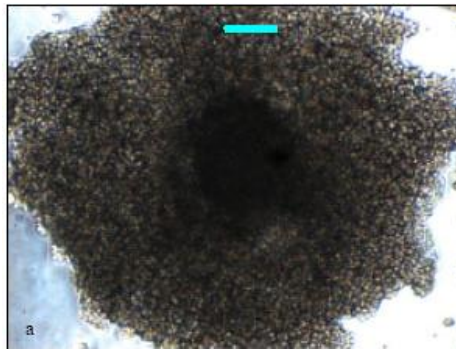


Imagen12. Ovocito con cúmulus expandido con 24h de maduración.

(Fuente: CNRG, 2014)

2.2. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES.

El proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales los cuales independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son:

- Maduración de ovocitos
- Fecundación de ovocitos maduros
- Cultivo de embriones (Grafico 2)



Estos tres pasos comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos muchos de los cuales son aún desconocidos, condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente.

Luego de la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a madurar alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas de iniciada la maduración.

De estos, aproximadamente el 80% es fecundado y comienzan a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto (B) o blastocisto expandido (Bex) que se considera su desarrollo durante 6-7 días.

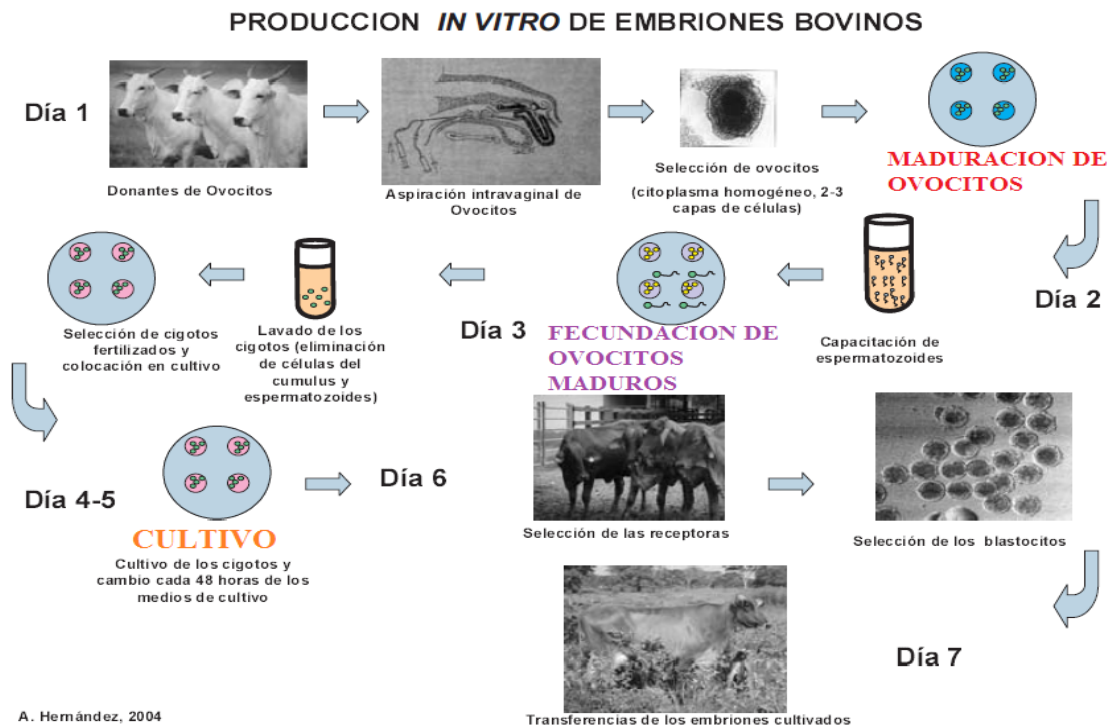


Gráfico 2. Esquema de la PIV.
(Fuente: Hernández, 2011)



Estos tres pasos comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos muchos de los cuales son aún desconocidos, condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente.

Luego de la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a madurar alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas de iniciada la maduración.

De estos, aproximadamente el 80% es fecundado y comienzan a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto (B) o blastocisto expandido (Bex) que se considera su desarrollo durante 6-7 días.

Esto indica que el cultivo embrionario correspondiente al paso más prolongado dentro del proceso de producción *in vitro*, es el período en el que se establece el mayor porcentaje de pérdidas del sistema. A su vez, durante esta etapa se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos (Felmer, 2006).

2.2.1. MADURACIÓN DE OVOCITOS

La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo, durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de profase hasta el de metafase (maduración nuclear). El ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de hormona luteinizante (LH), o bien cuando es retirado del folículo para llevar a cabo la maduración *in vitro*. Un periodo de 24 horas es necesario para que el ovocito bovino complete la maduración nuclear, es decir alcance el estadio de metafase en el que permanece hasta el momento en que es fertilizado y forman pronúcleos.



Además de la maduración nuclear, también es importante que exista una maduración citoplasmática, ya que prepara al ovocito para la fertilización y aportar los nutrientes requeridos para el desarrollo embrionario temprano. De manera natural, la meiosis inicia en el ovario fetal pero se detiene antes del nacimiento en la profase de la primera división meiótica, los ovocitos pasan entonces a la etapa reticulada que es un estado de reposo nuclear y que suele durar hasta que se ovula el primer ovocito en la pubertad. Los ovocitos en reposo o inmaduros tienen un gran núcleo denominado vesícula germinal. La meiosis avanza desde la etapa de vesícula germinal hasta la metafase de la segunda división meiotica en la que se detiene una vez más, dando como resultado un primer cuerpo polar que es expulsado al espacio perivitelino. De la misma manera en la que madura el núcleo se debe llevar a cabo la maduración del citoplasma (Zarate, 2006).

En los últimos años se ha podido demostrar que la adquisición de capacidad para desarrollar ovocitos es un proceso que comienza mucho antes del periodo periovulatorio antes de la ruptura de la vesícula germinal. En este sentido se ha demostrado que ovocitos contenidos en folículos antrales de más de 2-6 mm presentan una mayor capacidad para desarrollar respecto a aquellos contenidos en folículos de menor diámetro.

Recientemente se han desarrollado protocolos de estimulación ovarica en bovinos dando la tendencia a aumentar la presencia de folículos de mayor diámetro al momento de la punción folicular con los que se han obtenido tasas de producción de embriones hasta de un 80%.

Cuando los ovocitos son aspirados desde los folículos terciarios reanudan espontáneamente la meiosis y al ser cultivados *in vitro* continúan con los procesos de maduración. De este modo la composición de los medios y el ambiente controlado en estufas de cultivo, deben brindar un ambiente adecuado para que la maduración ocurra en 24 horas de un modo similar a lo que sucede



in vivo durante más de dos ciclos estrales en el bovino. Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios para lograr este ambiente involucra el uso de medios de cultivo tales como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc.), antioxidantes (glutati3n, cisteamina, cistina), factores de crecimiento y macromoleculas (suero, albumina), en una atm3sfera de 5% CO₂ a 38.5°C y humedad a saturaci3n (INTA, 2010).

La maduraci3n en los ovocitos obtenidos por el m3todo de corte fue de 32%, diversos estudios han evaluado la maduraci3n bajo diferentes protocolos, as3 se tiene que utilizando el mismo procedimiento de corte Motlik, et. al. (1984) obtuvieron ovocitos a partir de fol3culos peque1os de 0.3 a 0.7 mm, de 0.8 a 1.6 mm, de 1.7 a 2.2 mm, y de 3 a 5 mm, con porcentajes de maduraci3n de 0%, 17%, 50% y 76%, respectivamente. Al respecto, mencionan que para completar la meiosis no es 3nicamente el tama1o ya que el tiempo de incubaci3n es determinante, en la incubaci3n por 24 horas obtuvieron el 8% y por 48 horas el 76% de maduraci3n en ovocitos obtenidos de fol3culos de 3 a 5 mm; Por otro lado, Bjerregaard et. al. (2004) observaron los mismos di3metros foliculares donde obtuvieron el 21%, 27% y 20% de maduraci3n; mientras que Wu et al. (2001) con fol3culos de 1 a 3 mm (fol3culos prenatales) encontraron el 51% de maduraci3n, lo cual indica que el tama1o del fol3culo al momento de cortar es importante para la maduraci3n de los ovocitos *in vitro*; en otra investigaci3n de Marchal et al. (2002) con fol3culos de <3 mm, 3-5 mm y >5 mm, obtuvieron 44%, 77% y 86% de maduraci3n respectivamente. Se kse1ala adem3s que la competencia para alcanzar la meiosis del ovocito se da en fol3culos con un di3metro de 3 mm o m3s. Los resultados diferentes de maduraci3n pueden ser consecuencia del tama1o de los fol3culos que se cortaron ya que en los de 3 mm puede existir la posibilidad de que al igual que los obtenidos por punc3n se obtengan ovocitos de corteza ov3rica y no de la periferia lo que influye en los resultados de maduraci3n *in vitro*.



La maduración obtenida en los dos métodos utilizados fue similar, aunque inferior a lo reportado por Özturkler (2002), quien obtuvo un porcentaje de 95% y menciona que ésta fue similar entre los folículos puncionados de 2-5 mm y folículos cortados de 4-6 mm. Los ovocitos obtenidos por corte son de mejor calidad por no estar expuestos al daño que ocasiona el proceso de succión como lo reporta Muñoz (2005), lo cual no fue manifiesto en el presente trabajo posiblemente debido a que se aplicó el mismo procedimiento de selección para los dos grupos (punción y corte).

En general, se considera que la maduración puede variar dependiendo del ciclo en donde se ubicaron los folículos al momento del estudio (Arlotto *et al.*, 1996).

2.2.2. FECUNDACIÓN DE LOS OVOCITOS.

Consiste en incubar los ovocitos madurados (producto de la fase anterior) con espermatozoides vivos y móviles durante un periodo de 6 a 24 horas, luego de un proceso de selección y capacitación espermática que permitirá a su vez desechar componentes del plasma seminal, crioprotectores y espermatozoides muertos o con escasa vitalidad. La capacitación espermática generalmente se logra exponiendo los espermatozoides vivos a concentraciones de heparina y cafeína, entre otras. Estas sustancias logran estimular el proceso de capacitación del espermatozoide que lo prepara para interactuar y fecundar el óvulo (Hernández, 2011).

Una vez que se dispone de ovocitos maduros, el siguiente objetivo es lograr la fecundación de los mismos, para ello se incuban junto con espermatozoides capacitados en un medio suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y albúmina sérica. En la especie bovina, la capacitación espermática se



ve favorecida por la incorporación de heparina al medio. No obstante, para lograr unos resultados óptimos es necesario ajustar la concentración de heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado concreto (INTA, 2004).

En el caso de la fecundación in vitro, los ovocitos madurados son co-cultivados con espermatozoides en medios especiales y en un ambiente controlado en estufas de cultivo por un tiempo comprendido entre 5-24 horas dependiendo del protocolo, la concentración de espermatozoides y la calidad del semen utilizado.

Con el fin de lograr los procesos de capacitación, reacción del acrosoma y pasar a través de las barreras ovocitarias, el semen debe ser tratado rápidamente antes de co-cultivar los espermatozoides con los ovocitos. Este tratamiento incluye la eliminación de todos los elementos presentes (plasma seminal, componentes del diluyente en caso de semen congelado-descongelado, contaminantes, etc.) excepto los espermatozoides vivos con motilidad progresiva.

Esto se logra mediante técnicas basadas en la migración de los espermatozoides (Swim up), la centrifugación en gradientes de densidad (Percoll) y filtración (lana de vidrio). De estas las más utilizadas son el Swim up y el Percoll.

Posteriormente se procede a iniciar el proceso de capacitación espermática que habitualmente se establece dentro del tracto reproductor femenino. Los dos elementos que juegan un rol importante para que esto se logre in vitro son:

- Incorporación de sustancias inductoras de la capacitación espermática como la heparina.
- Utilización de semen congelado-descongelado, proceso que induce cambios pro-capacitantes en los espermatozoides así conservados.



Por último se efectúa la dilución y el conteo de los espermatozoides móviles para alcanzar habitualmente una dosis inseminante de 1-6 millones de espermatozoides por ml de medio de fecundación dependiendo del protocolo utilizado (INTA, 2010).

2.2.3. CULTIVO DE EMBRIONES.

Aquellos embriones de 4 o más células resultantes de la fertilización *in vitro* (FIV) son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo embrionario donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta llegar a mórulas y blastocistos. Al llegar a estos estadios, los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras (en fresco) o congelados para su posterior uso. Durante esta etapa destacan la presencia en el medio de cultivo de diversas fuentes de energía como la glucosa y aminoácidos esenciales y no esenciales (Hernández, 2011).

Los medios utilizados para el cultivo de los embriones bovinos han sido clasificados en tres categorías: **indefinidos**, cuando se utiliza suero y co-cultivo con células somáticas; **semidefinidos**, cuando se omite el co-cultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica; y **definidos**, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona (INTA, 2004).

Luego de la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar alcanzan la metafase y expulsan el primer cuerpo polar. De estos aproximadamente el 80% son fecundados y comienzan a dividir, al menos hasta el estadio de 2-4 células. Sin embargo, solo un 25-40% alcanzan el estadio de blastocisto o blastocisto expandido. El cultivo embrionario corresponde al paso más prolongado dentro del proceso, es el



periodo que determina la eficiencia global del sistema así como la calidad de los embriones obtenidos (INTA, 2010).

Los primeros intentos de cultivar embriones bovinos in vitro se toparon con la dificultad de que los embriones no superaban la etapa de 8 a 16 células, situación denominada “bloqueo del desarrollo” que no implicaba la muerte inmediata del embrión pero que era irreversible. Para evitar este bloqueo se utilizó el co-cultivo con células somáticas o los medios condicionados por dichas células y se suplementaron con suero. Sin embargo, con el tiempo se demostró que la aplicación de estos procedimientos de cultivo generaba diversos inconvenientes. En primer lugar, esta metodología que implicaba la utilización de medios indefinidos dificulta notablemente el conocimiento de las necesidades de los embriones durante sus etapas de desarrollo temprano. Además, estas condiciones suponen un elevado riesgo de incorporar patógenos durante el cultivo. Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la incorporación de suero al medio de cultivo es uno de los principales factores responsables de la presentación del síndrome de exceso de volumen fetal y de la baja resistencia a la criopreservación de los embriones obtenidos (Herradón y Col., 2007).

En la actualidad existen numerosos medios de cultivo disponibles para permitir el desarrollo de los embriones bovinos in vitro y aunque es posible alcanzar estadios preimplantacionales avanzados mediante la utilización de los mismos, la cantidad y la calidad, comparados con los obtenidos in vivo aun no son del todo satisfactorias.

Los sistemas de cultivo in vitro pueden clasificarse de la siguiente manera:

Co-cultivo.- Involucra la asociación de los cigotos con otro tipo de células en el medio de cultivo. Para esto se utiliza células somáticas tales como las células



de la granulosa u oviductales, que al desarrollarse puede producir y liberar factores de crecimiento, hormonas, etc., que podría favorecer el desarrollo embrionario temprano. Se ha propuesto que las células somáticas podrían remover sustancias tóxicas o disminuir la tensión de oxígeno en el microambiente que rodea al embrión. Actualmente los cultivos se realizan en estufas que controlan el CO₂ y el O₂ para lograr un ambiente con presiones parciales entre 40-60 mmHg, las cuales son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas.

Definidos o no definidos.- Se refiere a aquellos donde se tiene o no conocimiento de todos los componentes con los cuales son preparados. En la actualidad los medios de cultivo tienden a ser de composición definida, lo cual ayuda a determinar los requerimientos específicos de los embriones y hacen posible la repetitividad de los resultados.

Secuenciales o no secuenciales.- Los no secuenciales son aquellos sobre los cuales no se efectúa modificaciones a lo largo del cultivo, mientras que los secuenciales son aquellos en los cuales la composición va siendo modificada mediante la adición de sustancias o el recambio del medio en función de los requerimientos o para eliminar productos del metabolismo embrionario que podría afectar su viabilidad (INTA, 2010).

2.3. COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

2.3.1. PARÁMETROS BIOFÍSICOS Y ELEMENTOS INORGÁNICOS.

Varios autores coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario son los siguientes:

- **Osmolaridad.** Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/Kg. Sin embargo,



existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario.

- **PH.** La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados in vitro desarrollan un pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7.2 y 7.6.

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

- **Fluido oviductal.** Bovino y ovino se caracteriza por bajos niveles de Na⁺ y altos niveles de K⁺, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos.

- **Agua.** Es el componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario. Las fuentes de agua utilizadas han sido el agua de lluvia, la obtenida por sucesivas destilaciones o actualmente la producida por sistemas de purificación que utilizan el principio de ósmosis reversa. En estos últimos equipos, el grado de pureza del agua puede ser controlado mediante la determinación de su resistencia al paso de la corriente eléctrica (cuanto mayor sea esta, mayor será su pureza). La mayor resistencia ofrecida es 18.3 megaohms-cm a 25°C (Fernández y col., 2007).

En todos los casos no se recomienda almacenar por largos periodos el agua que va a ser utilizada en medios de cultivo debido a la contaminación con metales pesados liberados desde los envases de plástico o vidrio (Mucci, 2010).



2.3.2. COMPUESTOS ORGÁNICOS.

Actualmente, existe una gran cantidad de información no siempre coincidente referida al efecto de ciertas hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, dos componentes son constantes en las formulaciones finales de los medios de cultivo utilizados corrientemente en la producción in vitro de embriones. Estos son:

Fuente de energía.

Las fuentes de energía más utilizadas en los medios de cultivo de embriones son en general el lactato, el piruvato y la glucosa. Se ha demostrado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo. La falta de utilización de la glucosa durante los primeros estadios estaría dada por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa. Esta enzima acelera la glucólisis catalizando la formación de fructosa 1-6 bifosfato a partir de fructosa 6 fosfato, y se encuentra controlada alostéricamente por el cociente ATP-ADP, particularmente alto en este período. En esta etapa, la adición de glucosa a los medios de cultivos no solamente no sería aprovechada, sino que, a su vez generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, en embriones bovinos a partir del estadio de 8-16 células y en respuesta a una alta demanda de energía necesaria para la compactación y la formación y expansión del blastocelo, el cociente ATP-ADP podría disminuir, y con ello la inhibición ejercida sobre la enzima mencionada, con lo cual aumentaría el consumo de glucosa. Este metabolito también participa en la síntesis de precursores de ácidos nucleicos y de lípidos



y su disponibilidad sería importante durante la eclosión fuera de la zona pelúcida.

Con respecto a los lípidos, poco se sabe acerca de la importancia que tendrían en la producción de energía durante el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, en los últimos años se ha debatido la posibilidad de mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados a través de la adición de ciertos componentes lipídicos a los medios de cultivo, específicamente ácido linoleico no como fuente energética sino como fluidificador de las membranas plasmáticas (Felmer, 2006).

Fuente de proteína.

Aminoácidos.- Varios autores indican que los aminoácidos se encuentran dentro de los elementos más importantes como participantes de la regulación del desarrollo embrionario. Estos elementos serían utilizados como fuente de energía, como buffer intracelular y para la síntesis de proteínas, siendo incorporados por transportadores de membrana específicos regulados en función del estadio de desarrollo o en respuesta a señales externas.

Se ha demostrado que los aminoácidos no esenciales favorecerían el desarrollo en estadios tempranos, mientras que los esenciales harían lo mismo en embriones de más de ocho células. Este cambio en la utilización de aminoácidos pareciera deberse a requerimientos específicos de las células embrionarias en donde las células trofoblásticas que dan origen a la placenta fetal utilizarían aminoácidos no esenciales y glutamina, mientras que las de la masa celular interna que originan al feto tendrían preferencia por los esenciales (Felmer, 2006).

Suplementación proteica.- Usualmente se agrega suero bovino y/o albúmina sérica bovina (BSA) como fuente de proteínas a los medios de cultivo



embrionario, aunque los resultados obtenidos tanto en producción como en sobrevida poscriopreservación tras su inclusión son contradictorios y motivo de numerosos estudios. El suero constituye la fracción líquida resultante del proceso de coagulación sanguínea, tanto in vivo como in vitro, y su calidad en términos de composición química depende usualmente del tipo y estado del donante ya sea suero fetal bovino (SFB), suero de ternero recién nacido, suero de novillo o vaca, suero de vaca en celo (SVC), y de la partida o lote de formulación.

La albúmina es una proteína plasmática de carácter ácido soluble en agua y constituye uno de los componentes más importantes del suero sanguíneo. Debido a la presencia de grupos reactivos en su molécula puede unirse a diferentes sustancias (ácidos grasos, hormonas, etc.) y transportarlas en sangre hasta sus órganos blanco. Junto con la inmunoglobulina G, son las proteínas más abundantes del fluido oviductal y su pureza puede variar entre lotes.

Algunos de los efectos benéficos que justifican la utilización del suero y la albúmina son:

- Proteger a los embriones en cultivo de sustancias tóxicas (ej. metales pesados).
- Aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas.
- Reducir la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental (placas de cultivo, pipetas, tubos, etc.).

Tanto el suero como la BSA tienen un rol similar como suplemento proteico. Sin embargo, la posible presencia de elementos no identificados ligados a ambos determina que algunos aspectos de su función no sean aun completamente comprendidos. En los últimos años, el suero ha sido objeto de numerosos estudios, tendientes a definir si su adición es definitivamente necesaria para



mejorar los resultados de producción in vitro en función de la cantidad y calidad de los embriones obtenidos.

Se ha observado que la adición de suero a los medios de cultivo tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadios y estimulando el desarrollo de mórulas y blastocistos. Al mismo tiempo, su empleo también se ha visto relacionado con una aceleración del desarrollo embrionario, asociado a un número mayor de células embrionarias y a una mejora en la tasa de producción y eclosión. Sin embargo, otros autores observaron que tanto la tasa de producción como el número de células embrionarias no fueron afectados por la presencia o ausencia de suero (Felmer, 2006).

Algunos efectos negativos que han sido atribuidos al uso de suero en los medios de cultivo son: alteraciones mitocondriales, excesiva producción de lactato, presencia de células oscuras y granuladas en la masa celular interna, aumento de células apoptóticas y disminución del número de complejos de unión entre los blastómeros. Además observaron alteraciones durante la preñez en hembras receptoras transferidas que gestan embriones producidos con suero tales como alargamiento del periodo de gestación y nacimiento de terneros con peso superior a lo normal. Datos recientes indicarían que la presencia de suero puede disminuir la expresión de genes de particular importancia para el desarrollo embrionario temprano como el de la conexina 43 y para el reconocimiento materno de la preñez como el interferón.

Estudios efectuados sobre embriones producidos in vitro indican que podría existir una mayor cantidad de lípidos así como diferencias en su composición dentro de las gotas citoplasmáticas de los embriones suplementados con suero. Esto podría contribuir a la mayor sensibilidad que estos presentan a la



criopreservación, comparados con los obtenidos in vivo o producidos in vitro sin suplementar con suero.

Actualmente se sugiere que el empleo de medios de cultivo libres de suero podría ser beneficioso para mejorar la calidad de los embriones producidos principalmente si son destinados a la criopreservación.

Otro punto importante respecto a la utilización del suero y la albumina, es que estos componentes pueden constituirse en la mayor fuente de contaminantes del medio de cultivo por lo que su uso aumenta el riesgo potencial de transmisión de enfermedades por vía de los embriones.

Si bien no está totalmente claro cuál es el rol endocelular por el que actuarían la albumina y el suero, algunas de sus propiedades físicas podrían ser reemplazadas mediante la utilización de sustancias definidas. El uso de polímeros sintéticos como el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona es frecuente desde hace varios años en la producción in vitro de embriones. Estos compuestos han demostrado proveer una buena actividad surfactante similar a la albumina, aunque se ha encontrado una menor tasa de producción de embriones y diferencias metabólicas importantes entre embriones cultivados con o sin este componente. Finalmente se ha observado un menor porcentaje de gestación logrado con embriones producidos en medios suplementados con estos compuestos comparado con los obtenidos con embriones cultivados con suero. Otro compuesto utilizado con el fin de reemplazar la albumina o el suero ha sido el hialuronato el cual ha demostrado resultados alentadores.

De este modo se abre un nuevo camino en el entendimiento de los requerimientos de los embriones en estadios preimplantacionales, en el cual el uso de medios definidos y libres de macromoléculas de origen biológico altamente variables tendrá seguramente un rol muy importante (INTA, 2010).



2.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.

- **Ventajas.**

- Evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos.
- Difusión del uso de semen valioso y escaso.
- Creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados por excelencia productiva y/o adaptabilidad.
- Prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos.
- Control de enfermedades del área reproductiva.
- Determinación y selección de embriones.
- Permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas (tuberculosis, brucelosis, leucosis).
- Aplicación de la transferencia de embriones en especies exóticas y en peligro de extinción.
- Permite el aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad: machos con oligospermias severas, hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital.

- **Desventajas.**

- Los embriones producidos in vitro son de menor calidad que los obtenidos in vivo.
- Bajo rendimiento, el porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40%.



- Existe una escasa resistencia a la Criopreservación, dificultando su conservación a largo plazo.
- Reducción del potencial de desarrollo pre y postimplantacional ocasionando bajos porcentajes de gestación (30 a 40%).
- Nacimiento de terneros muy voluminosos, con anomalías estructurales y funcionales conocido con el nombre de síndrome de exceso de volumen fetal que disminuyen el vigor de los animales en el momento de su nacimiento y provocan una mayor mortalidad perinatal.
- Incremento de la mortalidad embrionaria, abortos, problemas gestacionales como el hidroalantoides y alargamiento de la gestación.
- Incremento del porcentaje de distocias por exceso de volumen fetal.

3. METODOS DE CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS

Constituye una biotécnica que posibilita mediante la utilización de bajas temperaturas (-196 °C N₂ líquido) almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos.

Actualmente los métodos más utilizados para criopreservar embriones son la congelación convencional y la vitrificación.

3.1. CONGELACIÓN.

La congelación es la técnica de elección para la criopreservación de embriones bovinos producidos in vivo. En este tipo de embriones, la congelación convencional ha permitido obtener resultados ligeramente inferiores a los



registrados con embriones en fresco. Al mismo tiempo la introducción del etilenglicol como crioprotector permitió desarrollar la técnica de transferencia directa de embriones congelados-descongelados, posibilitando la aplicación de esta técnica en condiciones de campo sin necesidad de remover el o los crioprotectores utilizados.

Durante el procedimiento de congelación, las células embrionarias sufren cambios importantes asociados a la formación de hielo intra o extracelular que puedan disminuir la sobrevivencia poscriopreservación. Para poder minimizar estos problemas se han recurrido al uso de “sustancias crioprotectoras”, así como a tasas de descenso térmico controladas mediante la utilización de máquinas congeladoras programables de alto costo (Mucci, 2010).

Los crioprotectores son sustancias que protegen a las células durante su criopreservación con la finalidad de evitar el daño que puede causar el agua intracelular al formar cristales de hielo durante la congelación. Los crioprotectores hacen que salga el agua contenida en el interior de las células y al deshidratarlas evita la formación interna de cristales de hielo a bajas temperaturas.

También disminuyen el punto de fusión de las soluciones y mantienen el equilibrio intra y extracelular de electrolitos. Otra función es reducir el hielo durante la congelación. También reemplaza las moléculas de agua removidas durante la congelación, inhibe la actividad de muchas enzimas disminuyendo o suprimiendo la actividad de radicales libres responsables de lisis celular antes, durante y después de la congelación y descongelación y bloquean la toxicidad de otros crioprotectores (Zarate, 2006).

En la congelación de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores:

Permeables o intracelulares: De bajo peso molecular.



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

Todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma.

Impermeables o extracelulares: De alto peso molecular.

- Polivinilpirrolidona (PVP)
- Glucosa
- Fructosa
- Ficol
- Dextrano sorbitol
- Sucrosa
- Lactosa
- Trealosa
- Rafinosa
- Otros azúcares

Estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las células de los embriones durante el equilibrio (Celestinos y Gatica, 2002).



Los pasos generales durante el proceso de congelación de embriones pueden resumirse de la siguiente manera:

Exposición de los embriones a las soluciones de congelación.- Los embriones son congelados generalmente en una solución salina fosfato tamponada (PBS) suplementada con proteínas o macromoléculas (suero bovino, albumina bovina (BSA), a la cual se le adiciona sustancias denominadas crioprotectoras que modifican el comportamiento físico de la solución y protege a las células de los daños asociados al descenso térmico. Estas sustancias pueden penetrar o no la membrana plasmática de las células embrionarias (crioprotectoras penetrantes y no penetrantes) y para esta metodología se utilizan en concentraciones que no superan 2 Molar (M).

Los agentes penetrantes pueden reemplazar el agua intracelular antes del enfriamiento, lo cual en combinación con una tasa de descenso térmico reducirían los cambios de volumen celular y minimizarían la cristalización intracelular. Los crioprotectores no penetrantes ejercen su acción a través de un aumento en la osmoralidad de las soluciones de Criopreservación, promoviendo la deshidratación celular y disminuyendo entonces la formación y el tamaño de los cristales de hielo.

Envasado de los embriones.- Actualmente el elemento más utilizado para contener los embriones, tanto para la Criopreservación como para su transporte y/o transferencia a una hembra receptora, lo constituye la pajuela de plástico de 0,25ml de capacidad. Existen diversos métodos de cargar las pajuelas pero en la mayoría el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de 0.5 a 2 centímetros de solución de congelación separado de las otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones con sacarosa como en el método One-Step separados por burbujas de aire. En general, las pajuelas una vez cargadas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico (Grafico 3).

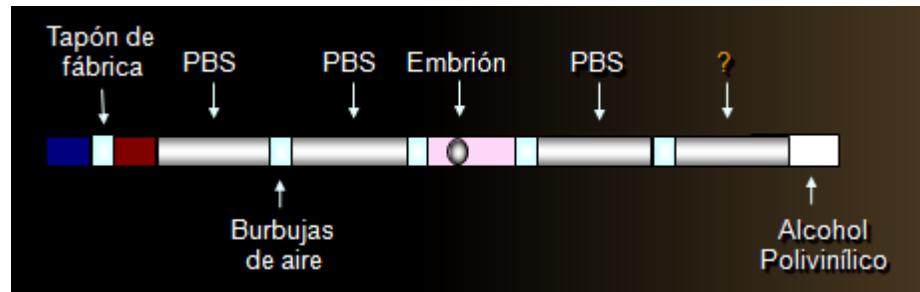


Gráfico 3. Envase de los embriones para congelación.

(Fuente. Mucci, 2010)

Enfriamiento inicial.- Se efectúa mediante la introducción de los embriones envasados en la criocámara de una máquina congeladora programable. Así, la muestra se enfría desde la temperatura de equilibrio hasta alrededor de -7°C .
Introducción de la cristalización o “seeding”.- Esto se efectúa luego de 5-7 minutos de introducidas las pajuelas en la criocámara, tocando el extremo de las pajuelas con un elemento metálico enfriado en N_2 líquido. Con este procedimiento se evita un sobreenfriamiento excesivo de la solución y por lo tanto se reduce el cambio de temperatura producido por la liberación de calor latente de cambio de estado.

Descenso térmico lento y controlado.- Se efectúa utilizando máquinas congeladoras programables, desde la temperatura en la cual se induce el “seeding” hasta -30 a -40°C y a tasas comprendidas entre $-0,3$ y $-0,5^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$. De este modo se logra una deshidratación celular suficiente como para minimizar la cristalización intracelular.

Descenso térmico rápido.- Alcanzada la temperatura de -30 a -40°C las pajuelas se introducen directamente en N_2 líquido. De este modo se alcanza, junto con el descenso térmico lento una formación controlada de cristales de hielo en la solución de congelación determinando finalmente la vitrificación del embrión y del medio que inmediatamente lo rodea.



Almacenamiento de N₂ líquido.- Se efectúa en contenedores (termos) de N₂ líquido a -196°C.

Descongelación.- Debe efectuarse de manera rápida para impedir el crecimiento de los cristales de hielo desarrollados durante la congelación, para la descongelación las pajuelas son retiradas del N₂ e introducidas en baño María a 30°C aproximadamente 30 segundos.

Extracción de los crioprotectores.- Luego de la congelación-descongelación la mayoría de los agentes crioprotectores deben ser extraídos de los embriones antes de ser transferidos a hembras receptoras o colocados en cultivo. Esto debe efectuarse porque al momento de la descongelación las células cargadas de crioprotectores deben ser expuestas a una solución que elimine éstos mismos, como puede ser PBS isosmolar, debido a que el agua difunde más rápido que estos compuestos a través de la membrana plasmática, las células se desintegran por el shock osmótico. Por este motivo se recurre a la rehidratación del embrión mediante pasajes a través de concentraciones y osmolaridades decrecientes del crioprotector utilizado. Otra alternativa es emplear sustancias no penetrantes como la sacarosa (buffer osmótico) cuya osmolaridad sea igual o ligeramente inferior a la alcanzada con el crioprotector penetrante utilizado, lo cual disminuye la entrada de agua mientras se produce la salida del crioprotector penetrante (INTA, 2010).

Método de congelación estándar con etilenglicol.

1. Preparar la solución de criopreservación de EG con el agregado o no de 0,1 M de sacarosa en PBS (solución Stock) (Cuadro 1) más el agregado de suero en una proporción final del 20%. Esta solución se colocara en una caja petri de 35 mm a temperatura ambiente.



Cuadro 1. Composición del medio de congelación. EG 1.5 Molar + 0.1 Molar de sacarosa.

(Fuente: Mucci, 2010)

REACTIVOS	UNIDADES
EG	1.68 ml
Sacarosa	0.684 g
BSA	80 mg
PBS	14.32 ml

PBS (solución Stock)

EG (etilenglicol)

BSA (suero bovino, albumina bovina)

2. Identificar la pajuela según normas IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones).

La identificación de la pajuela incluye lo siguiente: DT: indica que los embriones son congelados para transferencia directa, debiendo ser además las pajuelas de color amarillo. 515: indica el nombre o número de la donante. HO: raza de la donante. 1254896: número de registro de la donante. Matador: número o nombre del macho. HO: raza del macho. 6521487: número de registro del macho. 05No09: día, mes y año del procedimiento. 1EMB: número de embriones en la pajuela (Grafico 4).



Grafico 4. Identificación de la pajuela (Fuente: Mucci, 2010).

3. Colocar los embriones en la solución de criopreservación. El tiempo total de los embriones dentro del crioprotector deberá ser de alrededor de 10 minutos.



4. Cargar los embriones en las correspondientes pajuelas y cerrarlas con alcohol polivinílico.
5. Comenzar con el enfriamiento inicial colocando las pajuelas directamente a -7°C en la cámara de enfriamiento de una maquina congeladora programable durante 5 minutos.
6. Efectuar la inducción de la cristalización de manera manual, tocando las pajuelas en uno de sus extremos con un dispositivo metálico enfriado en N_2 líquido.
7. Luego de 5 minutos de inducida la cristalización comenzar el descenso térmico controlado desde -7°C hasta -35°C a razón de $0.5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.
8. Una vez alcanzada la temperatura de -35°C , retirar las pajuelas de la cámara de enfriamiento y rápidamente colocar las pajuelas directamente en N_2 líquido (grafico 5) (INTA, 2010).

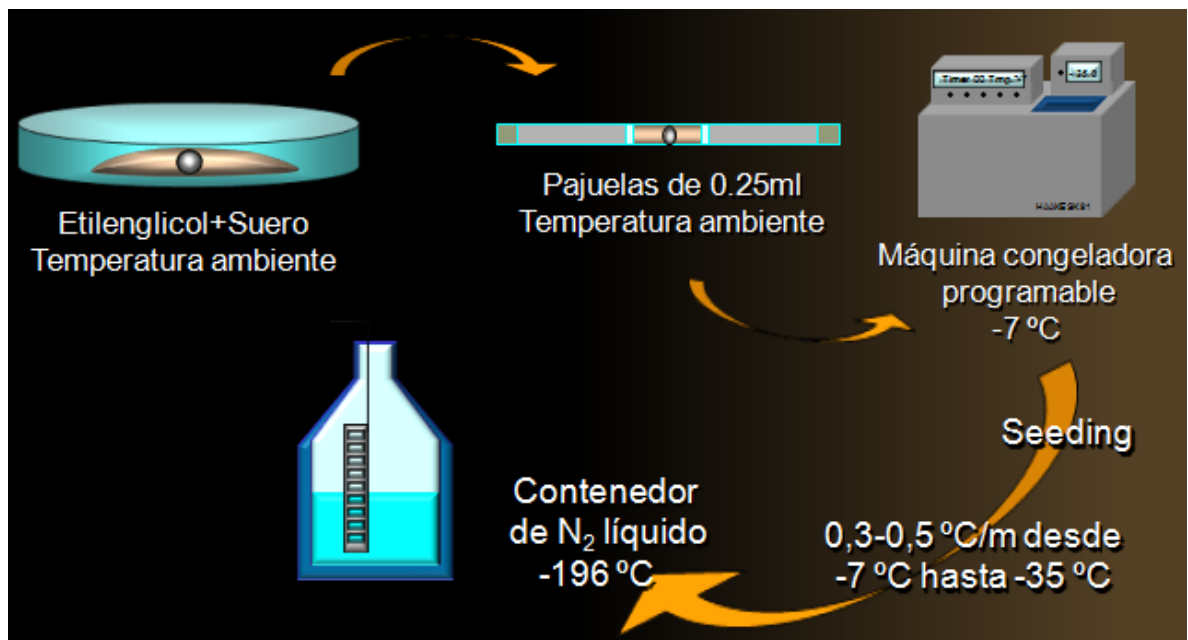


Grafico 5. Protocolo general de congelación de embriones.



(Fuente: Mucci, 2010)

3.2 VITRIFICACIÓN

El estado vítreo es aquel alcanzado por el rápido enfriamiento de un medio líquido en ausencia de cristales de hielo y con una elevada viscosidad. Esta solución adquiere un estado amorfo similar al vidrio, del cual toma su denominación.

Los factores que afectan la probabilidad de vitrificación de una solución son la viscosidad inicial, su volumen y la tasa de enfriamiento a la cual es sometida. Durante la vitrificación el rápido enfriamiento disminuye bruscamente el movimiento molecular, de modo que las moléculas de agua no tienen el tiempo suficiente para ordenarse y orientarse de acuerdo a sus cargas para formar los cristales de hielo.

Las características generales de la vitrificación son las siguientes:

- Descenso ultrarrápido de la temperatura.
- Utilización de crioprotectores en altas concentraciones.
- Muestra vehiculizada en un pequeño volumen de solución, lo cual posibilita aumentar la tasa de descenso térmico y/o disminuir la concentración de crioprotectores (Mucci y Aller, 2010).

Exposición de los embriones a las soluciones de vitrificación.- Las soluciones de vitrificación están formuladas con una combinación de crioprotectores (penetrantes y no penetrantes), un soporte líquido (PBS) y macromoléculas (suero BSA) estas soluciones se caracterizan por contener altas concentraciones de crioprotectores. En los últimos años se ha puesto



énfasis en evitar la utilización de suero en la formulación final de las soluciones de vitrificación.

Envasado de los embriones en recipientes apropiados y en pequeños volúmenes.- se ha utilizado con éxito las pajuelas de 0.25 ml de capacidad. Sin embargo en búsqueda de la conservación de ovocitos y embriones en pequeños volúmenes, se ha utilizado exitosamente rejillas de microscopía electrónica, pajuelas de 0.25 ml abiertas y estiradas (Open Pulled Straw (OPS)) (Grafico 6).

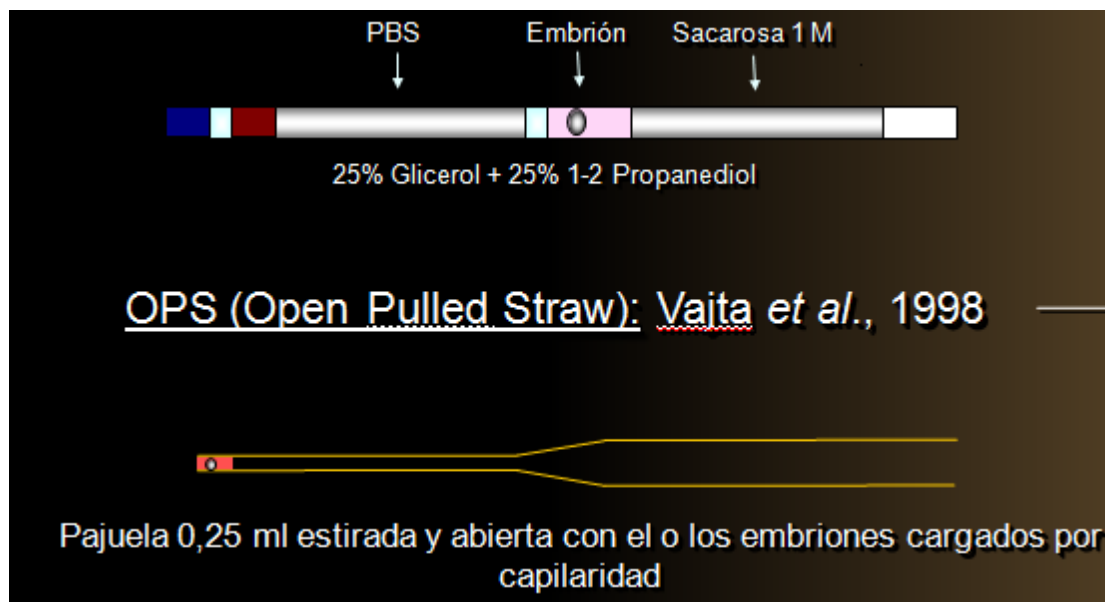


Grafico 6. Envasado de los embriones para vitrificación.

(Fuente: Mucci, 2010)

Descenso ultrarápido de la temperatura (vitrificación).- Se lleva a cabo en un solo paso introduciendo el soporte del embrión directamente en N₂ líquido, o en dos pasos, enfriándolo previamente durante un corto tiempo en los vapores del mismo. La introducción de las pajuelas de 0.25ml conteniendo soluciones de vitrificación en N₂ líquido permite alcanzar tasas de descenso térmico del orden de los 2.5°C/minuto, mientras que con OPS determinaron tasas de 22.5°C/minuto entre -25 y -175°C.



Calentamiento rápido de los embriones hasta temperaturas fisiológicas.-

Se introduce la pajuela en un baño María a 20 °C o a temperaturas comprendidas entre los 30 y 39 °C durante pocos segundos.

Extracción de los crioprotectores.- Una vez calentadas las pajuelas los crioprotectores penetrantes deben ser retirados de los embriones e inmediatamente deben ser rehidratados. Por ello se utiliza un buffer osmótico en una concentración suficiente para alcanzar una osmolaridad ligeramente inferior a la de la solución de vitrificación, este buffer (sacarosa) puede o no estar en la misma pajuela (Mucci, 2010).

- Vitrificación mediante la técnica Open Pulled Straw (OPS).

1. Las pajuelas de 0.25ml de capacidad serán calentadas sobre una platina térmica y estiradas manualmente hasta que su diámetro y pared disminuyan aproximadamente a la mitad. Posteriormente se procederá al corte de las mismas en su punto más delgado y a su identificación.

2. Los embriones serán colocados en una gota de 200µl de solución 1 de vitrificación durante 3 minutos (cuadro 2).

3. Tomar una gota de 40 µl de solución 2 de vitrificación (cuadro 3), luego con micropipeta tomar el embrión en un volumen de no más de 2 µl y descargarlo sobre la misma placa. Este proceso debe efectuarse en un total de 30 segundos.

Cuadro 2. Solución 1 para vitrificación de embriones mediante protocolo OPS.

(Fuente: Mucci, 2010)

REACTIVOS	UNIDADES
-----------	----------



EG	1ml
DMSO	1ml
TCM-199	6ml

Cuadro 3. Solución 2 para vitrificación protocolo OPS.

(Fuente: Mucci, 2010)

REACTIVOS	UNIDADES
Sacarosa	855mg
TCM-199	2ml
EG	1ml
DMSO	1ml

4. Las pajuelas serán cargadas aprovechando el efecto de capilaridad tocando con su extremo más delgado la última microgota donde se descargaron los embriones. Cumplidos los 30 segundos las pajuelas serán sumergidas en N₂ líquido (grafico 7).

5. Todas las maniobras deben ser efectuadas en platina térmica a 38.5 °C (INTA, 2010).

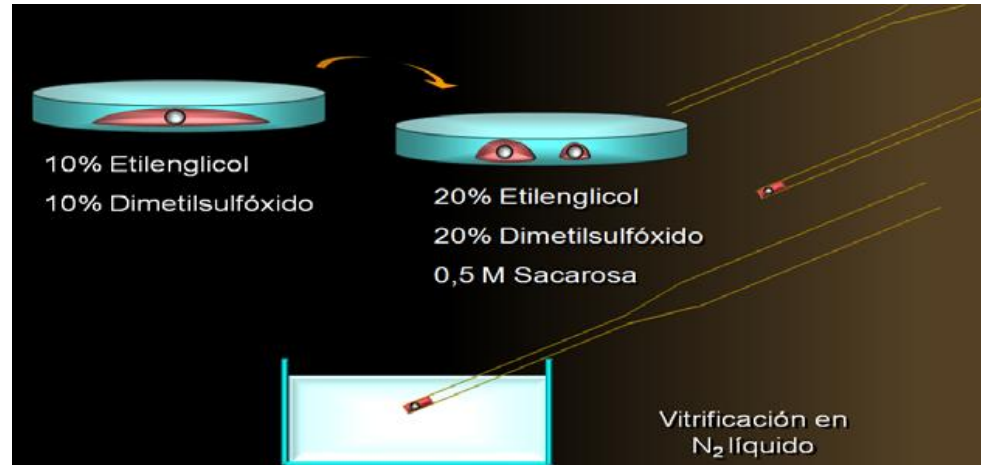


Grafico 7. Técnica Open Pulled Straw (OPS) (Fuente: Mucci, 2010).

4. EVALUACION DE EMBRIONES BOVINOS.

4.1. CLASIFICACIÓN Y ESTADÍO DE DESARROLLO EMBRIONARIA.

De acuerdo a las normas de la IETS, la clasificación de los embriones en función de su estadio de desarrollo se efectúa de manera numérica de la siguiente manera (Grafico 8):



Grafico 8. Clasificación de los embriones según normas IETS.

(Fuente. De la Fuente, 2009)

El código para el grado de desarrollo es numérico. El número 1 significa un ovocito sin fecundar o un embrión de una célula. El número 2 identifica embriones con 2 a 16 células. El número 3 identifica una mórula temprana, y los números del 4 al 9 identifican a los embriones en estadios posteriores a la compactación (Cuadro 4) (INTA, 2010).



CODIGO	ESTADO	DIAS
1	NO FERTILIZADO	
2	DE 2 A 12 CELULAS	2-4
3	MORULA	5-6
4	MORULA COMPACTADA	6-7
5	BLASTOCISTO TEMPRANO	7
6	BLASTOCISTO	7-8
7	BLASTOCISTO EXPANDIDO	8
8	BLASTOCISTO ECLOSIONADO	8-10

Cuadro 4. Valoración morfológica según IETS.

(Fuente. De la Fuente, 2009)

4.2. CALIDAD EMBRIONARIA.

De acuerdo con las normas Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones IETS, el código para clasificar la calidad embrionaria basada en la integridad morfológica de los embriones es de tipo numérico. Los códigos de calidad embrionaria varían de 1 a 4.

1. Excelente.- Masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Las irregularidades deberían ser relativamente menores, y al menos el 85% del material celular debería ser una masa embrionaria intacta y viable. La zona pelúcida deberá presentar superficies lisas sin superficies cóncavas, planas o delgadas que pudieran causar adhesión de los embriones al material utilizado durante las manipulaciones.

2. Bueno.- Irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.



3. Regular.- Irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.

4. Malo (muerto o degenerado).- Embrión, ovocito o embriones de 1 célula degenerados no viables (INTA, 2010).

5. PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.

Siempre se deben manejar los embriones usando materiales y medios estériles. Posteriormente todas las manipulaciones deben seguir los protocolos descritos con total exactitud. Se requiere un cuidado especial para lavar los ovocitos y embriones. Generalmente se usan tres o más lavados entre cada paso de producción de embriones FIV. Se deben usar cajas Petri o cajas con “pozos” estériles conteniendo el medio apropiado. Se recomienda una agitación suave durante cada lavado, solo deben lavarse juntos óvulos y embriones del mismo lote (ovarios del rastro) o recuperados de la misma donante (aspiración de óvulos) (Stringfellow y Siedel, 2000).

5.1. Procedimiento para la obtención y maduración de ovocitos.

Día 1.

- Acondicionamiento del material y aspiración de los ovocitos.

1. Los ovocitos obtenidos a partir de ovarios del rastro o de vacas castradas, son transportados al laboratorio en un termo (Imagen 13) con solución salina estéril más el agregado de antibiótico antimicrobianos (cuadro 5) a una



temperatura de 20-25 °C. A esta temperatura los ovarios podrían permanecer en el termo hasta aproximadamente 2-5 horas sin afectar los resultados posteriores. Cuando el transporte deba efectuarse durante un periodo más prolongado es conveniente disminuir la temperatura hasta unos 15-16 °C.



Imagen 13. Termo de transporte de ovarios.

(Fuente: Mucci, 2010)

Cuadro 5. Formulación final del medio de capacitación.

(Fuente: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
TL- sperm stock	10ml
BSA	60mg
Piruvato	1.1mg
Gentamicina stock	10µl

2. Una vez en el laboratorio, los ovarios serán acondicionados, eliminándose los restos de cuerno uterino, oviducto y/o ligamentos (Imagen 14).



Imagen 14. Acondicionamiento de los ovarios.
(Fuente: Mucci, 2010)

3. Lavado de los ovarios tres veces en solución salina (Imagen 15).



Imagen 15. Ovarios luego de lavado.
(Fuente: CNRG, 2014)

4. Posteriormente se procederá a la punción de los folículos de 2-10 mm de diámetro, utilizando agujas de 21g para aspirar su contenido, a 50 mmhg de presión negativa (Imagen 16).



Imagen 16. Bomba de vacío para la aspiración de ovocitos.

(Fuente: CNRG, 2014)

La importancia de los elementos de punción y aspiración (diámetro de la aguja, largo de la tubuladura, presión de aspiración, entre otros) determinan una buena medida de calidad de los ovocitos recolectados y la eficiencia del sistema de aspiración. Una tasa de recuperación normal se encuentra en alrededor de 50-60% de ovocitos recuperados por folículo punzado (Imagen 17).



Imagen 17. Aspiración de ovocitos.

(Fuente: Mucci, 2010)



Puede decirse que a medida que se aumenta la presión de aspiración, será posible aumentar la tasa de recuperación, pero al mismo tiempo se obtiene una mayor cantidad de ovocitos desnudos.

- **Lavado y selección de los ovocitos.**

1. Luego del llenado de cada tubo conteniendo fluido folicular, estos deberán permanecer en reposo durante 10-15 minutos con el propósito de que los complejos cúmulus-ovocito decanten y formen un pellet en el fondo del tubo.
2. El pellet será recolectado con pipeta Pasteur y colocarlo sobre una caja de búsqueda (Imagen 18).
3. Se selecciona los ovocitos y se lava al menos tres veces a través de gotas en medio de maduración en la caja de Petri (Imagen 19).

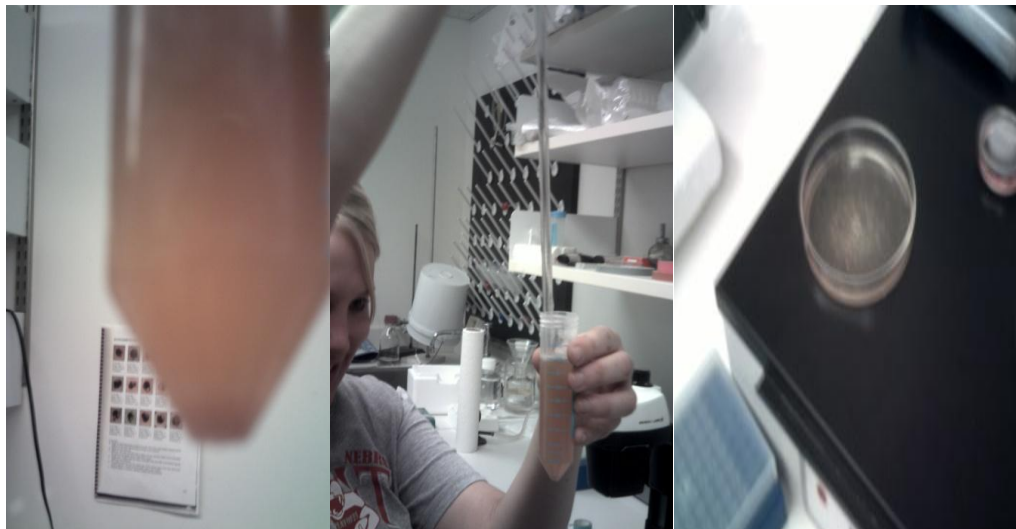
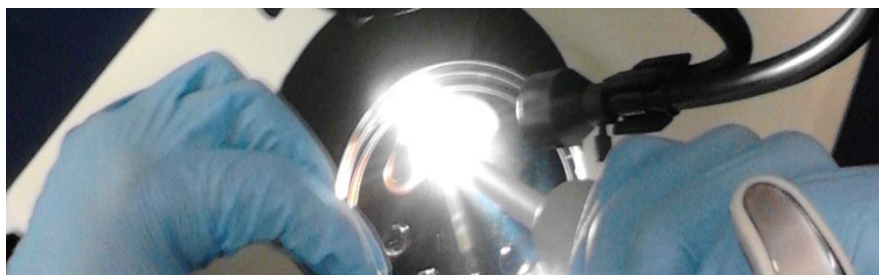


Imagen 18. Extracción del pellet y caja de búsqueda (Fuente: CNRG, 2014).



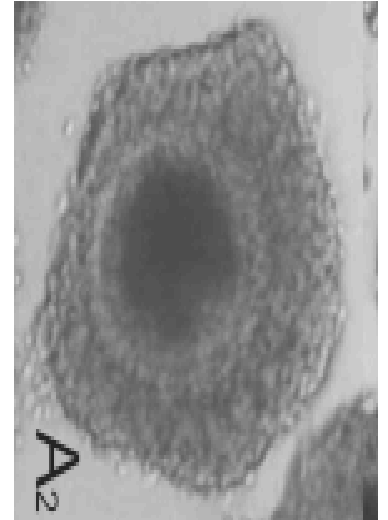


Imagen 19. Lavado y selección de ovocitos.

(Fuente: CNRG, 2014)

El propósito de este lavado será la eliminación del fluido folicular que vehiculiza los ovocitos, así como posibles contaminantes provenientes de la sala de punción.

5. Una vez lavados y seleccionados, serán posteriormente colocados en grupos de hasta 50 ovocitos por cada poso, en cajas de cultivo conteniendo medio de maduración (imagen 20).





Imagen 20. Cajas de cultivo. Compuestas de 4 pozos cargadas con medio de maduración.

(Fuente: Mucci, 2010)

6. Se pone a cultivar en estufa a 38,5°C, 5% o 4% de CO₂ y humedad a saturación durante 20-24 horas (Imagen 21) (Grafico 9) (INTA, 2010).

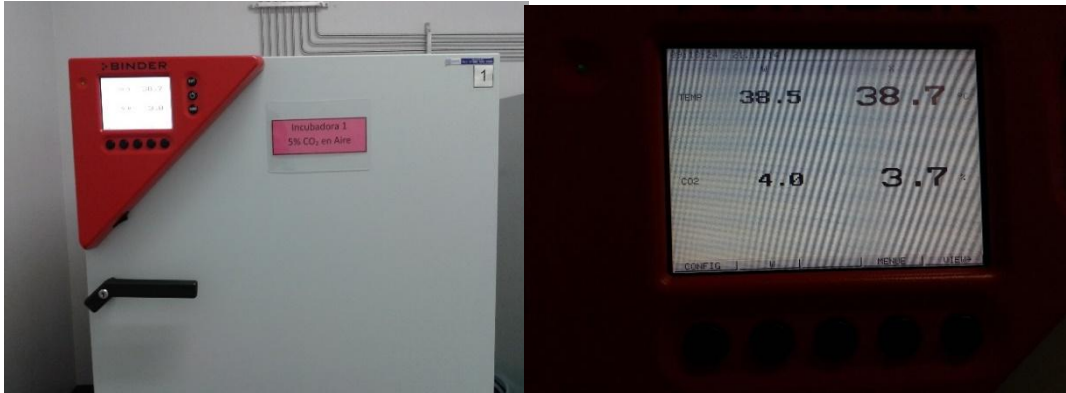


Imagen 21. Estufa de cultivo con control de temperatura y CO₂ utilizada para maduración y fecundación de ovocitos (Fuente: CNRG, 2014).

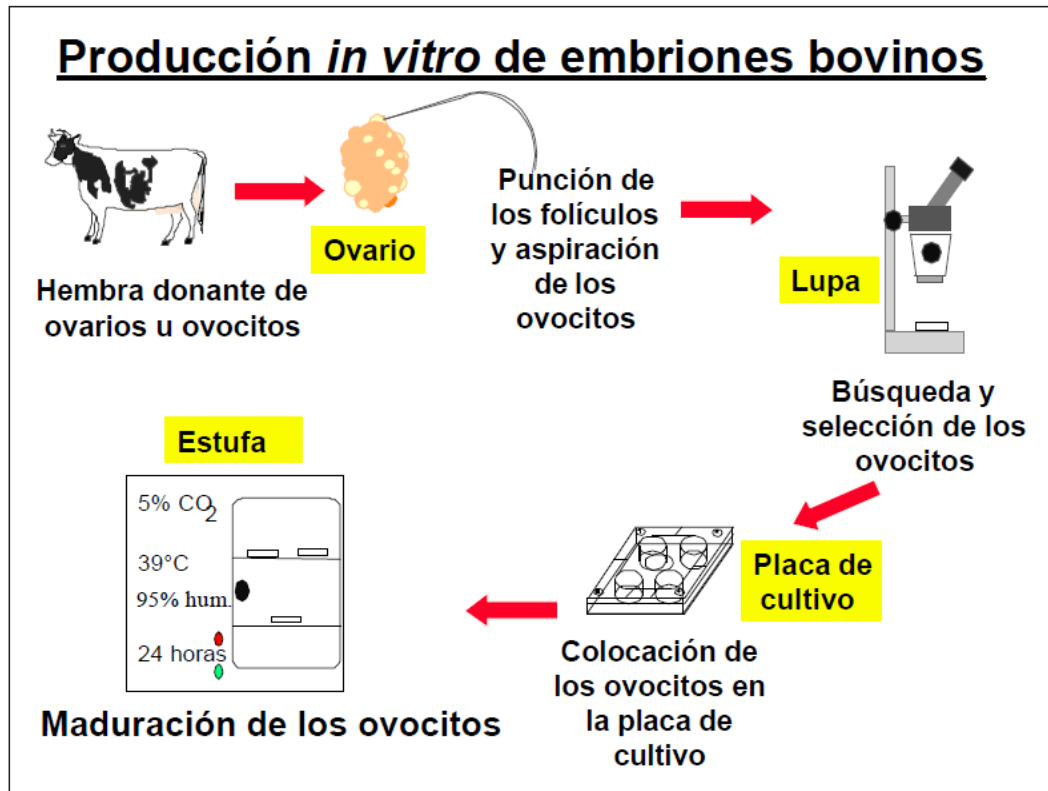


Grafico 9. Esquema PIV desde la obtención de ovocitos hasta su maduración.

(Fuente: INTA, 2011)

5.2. Metodología de fecundación *in vitro* de embriones bovinos.

Día 2.

Entre las 20-24 horas de iniciada la maduración se procede a la fecundación de los ovocitos utilizándose para este procedimiento semen congelado-descongelado.

Previo al comienzo de las maniobras de este día se deberán retirar de la incubadora las cajas de maduración y observar la coloración del medio.

- Procedimiento:



1. Cargar nuevas cajas de cultivo con medio de fecundación. De acuerdo a este protocolo por cada poso se colocara 400µl de medio de fecundación (soluciones salinas: tiroides lactato modificado (TALP), IVF-SOF; cuadros 7-8-9) + 20µl de una solución de heparina diluida en medio de fecundación (cuadro 10) como inductor de la capacitación espermática. Posteriormente colocar en estas cajas los ovocitos que fueron puestos a madurar el día anterior.

Cuadro 6. Medio de fecundación IVF-SOF (50ml).

(Fuente: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de sodio	315mg
Cloruro de K	26,8mg
KH ₂ PO ₄	2mg
Bicarbonato de sodio	105mg
Penicilina	3,25mg
Piruvato de sodio	2,75mg
BSA FAF	400mg
Fructosa	4,5mg
Cloruro de calcio	12,6mg
Aminoácidos	500µl
Lactato de sodio	23,5µl
Agua ultrapura csp	50ml

Cuadro 8. Formulación final del medio de fecundación.

(Fuente: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
FIV stock	10ml
BSA	60mg
Piruvato stock	100µl



Cuadro 9. Dilución de heparina para la fecundación.

(Fuente: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
Heparina	1mg
Medio de fecundación	1ml

Cuadro 7. Medio de fecundación (FIV)

(Fuente: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de sodio	666ml
Bicarbonato de sodio	210mg
Cloruro de	23,5mg
potasio	
KH ₂ PO ₄	4,7mg
Rojo fenol	1mg
Penicilina	6,5mg
Lactato de sodio	186µl
Cloruro de magnesio	10mg
Cloruro de calcio	39,7mg
Agua ultrapura	100ml

2. Si el semen está congelado en pajuelas en N₂ líquido (Imagen 22), la misma deberá descongelarse en un baño María a 30°C, durante 30 segundos (Imagen 23). Posteriormente y una vez secada la pajuela se efectuara el corte de uno de sus extremos y se introducirá en un tubo de 5ml estéril. Luego se efectuara el corte del otro extremo y se descargara de este modo la columna de semen dentro del recipiente estéril.



Imagen 22. Termo conteniendo semen en N_2 líquido (Fuente: Mucci, 2010).



Imagen 23. Baño María utilizado para la descongelación de semen.

(Fuente: Mucci, 2010)

3. Independientemente de la forma de la presentación del semen este deberá ser acondicionado con el propósito de eliminar diluyentes, células muertas, etc., mediante al menos una de las dos metodologías.

4. Una vez obtenida la suspensión de espermatozoides libre de diluyentes y células muertas, se procede a la determinación de la concentración espermática para efectuar la fecundación con la dosis requerida.



5. Preparar la cámara (Neubauer) para conteo de espermatozoides (colocar un cubre objetos (Imagen 24)).



Imagen 24. Cámara de Neubauer (Fuente: Mucci, 2010).

6. Diluir la suspensión de espermatozoides al 5% en agua. Tomar 95 μ l de agua y agregarle 5 μ l de la suspensión de semen obtenida luego de la última centrifugación. Homogenizar y cargar la cámara para efectuar el conteo.

7. Llevar al microscopio y contar 5 cuadrados de doble borde (x400).

8. Cálculo para la fecundación: Este cálculo contempla la dilución efectuada sobre la muestra espermática dividido por el número de espermatozoides que se contaron. El resultado corresponde al volumen en μ l que se debe tomar del tubo que contiene los espermatozoides para fertilizar con un millón de espermatozoides por ml en FIV.

9. Colocar en cada poso de la caja de cultivo la cantidad de semen correspondiente y llevarlas a estufa durante 24hs (Grafico 10). La dosis



espermática es generalmente de 1-2 millones de espermatozoides por ml de medio (INTA, 2010).

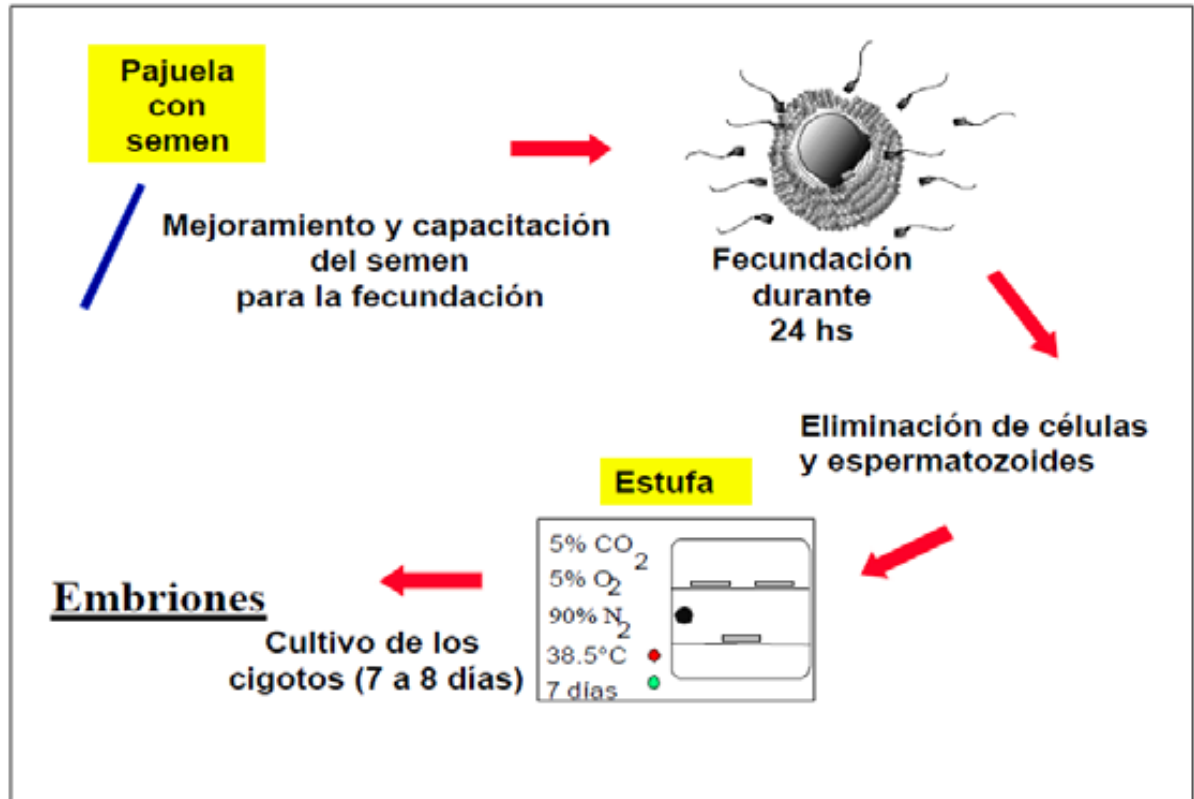


Grafico 10. Esquema PIV para la fecundación.

(Fuente: INTA, 2011)

- **Acondicionamiento del semen por centrifugación gradientes de Percoll.**

1. Se colocan 2 ml de Percoll 90 en el fondo de un tubo cónico de 15 ml y sobre esa capa se depositan muy lentamente 2 ml de Percoll 45, cuidando de no mezclar los gradientes, sobre estos se deposita lentamente una dosis de semen descongelado, se centrifuga a 2700 G por 20 minutos y se retiran las capas superiores (diluyente seminal, Percoll, espermatozoides no móviles) (Imagen 25).



Imagen 25. Tubo con Percoll al 90 y 45% y semen descongelado.

Fuente: CNRG, 2014

2. Se deja el pellet de espermatozoides motiles que se forma en el fondo.
 3. Se agregan 4 ml de medio de fecundación (FCDM) y se vuelve a centrifugar a 1600 G por 5 minutos.
 4. Se retira sobrenadante y se deja el pellet de semen con un poco de medio.
 5. Luego de esto se elimina el sobrenadante, quedando un pellet de aproximadamente 150 μ l conteniendo la suspensión de espermatozoides con la cual se procederá a la fertilización (Grafico 11).
- Se puede aprovechar este tiempo de 5 minutos para cambiar los ovocitos de las placas de maduración a las nuevas placas con medio de fecundación (Hincapié, 2010).

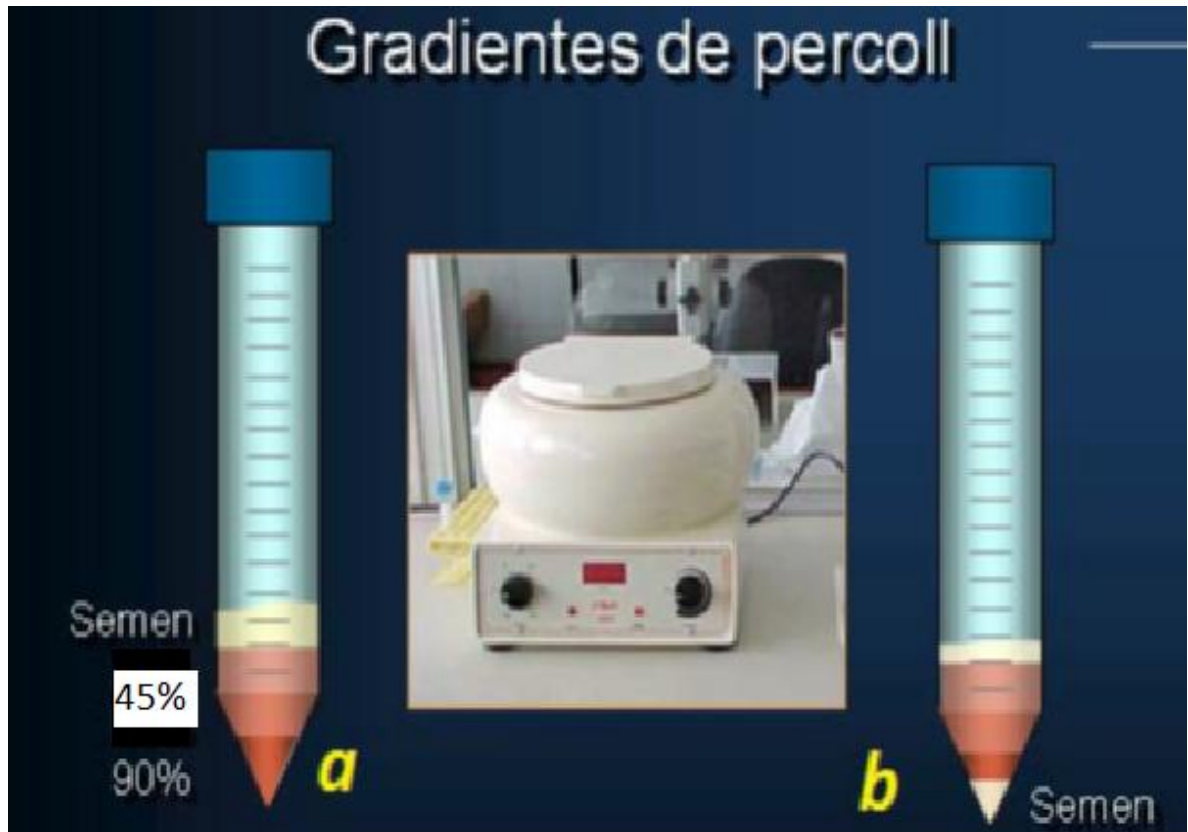


Grafico 11. Técnica de centrifugación en Percoll, (a) semen adicionado sobre la columna de gradientes de Percoll en tubos de centrifuga. (b) posición de los espermatozoides motiles luego de la centrifugación a 1600 G durante 5 minutos.(Fuente: Mucci, 2010)

6. Se toman los ovocitos del medio de maduración y se enjuagan en HCDM-M (sin aditivos) o HCDM-1 Se pueden quitar los ovocitos que no expandieron o aquellos cuyo citoplasma amerite descarte.

7. Colocar 10 ovocitos en gotas de 90 uL ó 50 ovocitos en pozos con 450 uL de medio de fertilización

(FCDM) adicionado con heparina, cafeína y PHE (Penicilamina, Hipotaurina y Epinefrina).



La separación en gradientes de Percoll así como la adición de aditivos al medio de fertilización favorecen la capacitación espermática.

5.3. METODOLOGÍA PARA EL CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.

Día 3.

- Eliminación del exceso de células del cumulus (desempaquete)

Luego de 18 horas de la fecundación los presuntos cigotos deben ser desnudados (eliminación del cúmulus), estos sometiéndolos a lavados en medio de cultivo y colocados en cajas petri donde se efectúa la maduración de los ovocitos (co-cultivo con células de la granulosa) o en nuevas placas (sin co-cultivo) y colocarlos en estufa a 38.5 °C en una atmosfera de 5% de O₂, 90% de N₂ y humedad a saturación hasta 48-72 horas, momento en el que se procede al conteo de los ovocitos divididos (porcentaje de división a 48-72 horas).

Posteriormente se continúa con el cultivo hasta el día 7 donde se evalúa el porcentaje de producción de embriones y se procede a su transferencia o criopreservación.

- Procedimiento detallado.

1. Revisar las cajas de maduración por posible presencia de contaminación. Se aspira el contenido y se reemplaza por 100 µl de medio de cultivo (cuadro 10-11). En caso de no efectuar co-cultivo con células de la granulosa se procederá al llenado de nuevas placas.

Cuadro10. Medio de cultivo CR1 Stock para cultivo de embriones.



(Fuente: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de sodio	670.32mg
Bicarbonato de sodio	220.11mg
Cloruro de potasio	23.11mg
Rojo fenol	1mg
Lactato de calcio	63.55mg
Piruvato de sodio	4mg
Agua ultrapura	100ml

Cuadro 11. Formulación final del medio de cultivo CR1 suplementado con 3 mg/ml de BSA y aminoácidos (AA).

(Fuente. Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
CR1 stock	9.7ml
BSA	30mg
BME (AA no esenciales)	200µl
MEM (AA esenciales)	100µl
Glutamina	1.5mg

2. Preparar la pipeta con capilar de vidrio necesaria para el manejo de los embriones.

3. Poner medio de cultivo en un Eppendorf (vial) y pasar los presuntos cigotos a éste para efectuar el desempaque mediante agitación mecánica utilizando un vortex durante 90 segundos (Imagen 26) o mediante la utilización de micropipetas (Imagen 27).



4. Posteriormente lavar las paredes del tubo con medio de cultivo, aspirarlo y descargarlo en una caja petri para búsqueda. Agregar 400 μ l de medio en el tubo y enjuagar nuevamente las paredes del mismo



Imagen 26. Agitación en vortex. Útil para la eliminación de las células de la granulosa.(Fuente. CNRG, 2014).

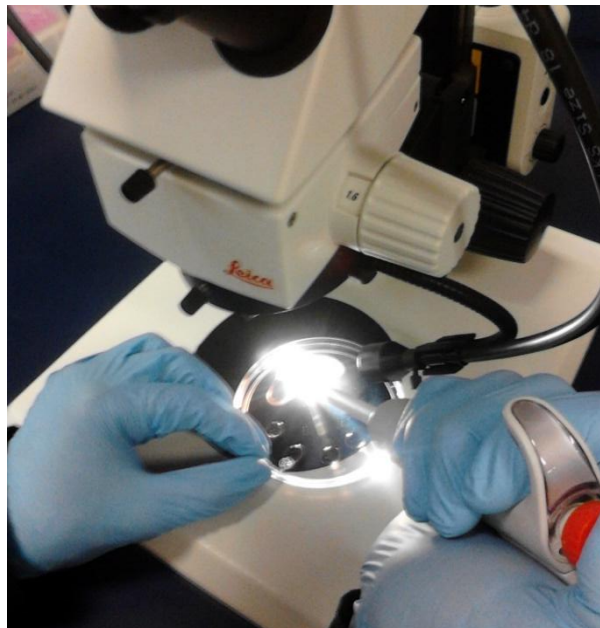


Imagen 27. Uso de micropipeta.

(Fuente: Mucci, 2010)



5. Efectuar la búsqueda (Imagen 28) y el lavado de los cigotos mediante el pasaje a través de gotas de medio de cultivo.

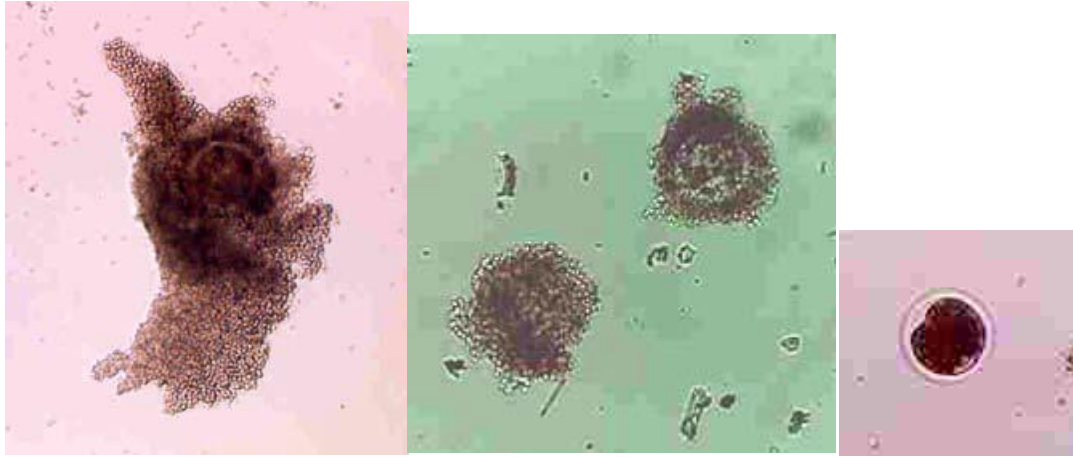


Imagen 28. Cigotos luego del desempaque.

(Fuente: Mucci, 2010)

6. Es necesario realizar varios lavados y búsquedas en el tubo hasta que aparezcan más cigotos (2-3 veces). Posteriormente observar el tubo bajo lupa para detectar la posible presencia de cigotos adheridos a su pared.

7. Una vez lavados y seleccionados colocar los presuntos cigotos en las cajas de cultivo previamente preparadas.

8. Colocar las cajas en estufa y cultivar bajo las condiciones descritas, estufa a 38.5 °C en una atmosfera de 5% de O₂, 90% de N₂ y humedad a saturación hasta 48-72horas.

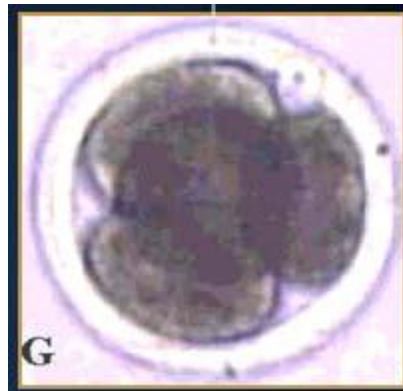
9. Posteriormente se continúa con el cultivo hasta el día 7 donde se evalúa el porcentaje de producción de embriones en sus diferentes estadíos (Grafico 12) y se procede a su transferencia o criopreservación (INTA, 2010).



Estadío de dos células.



Estadío de cuatro células.



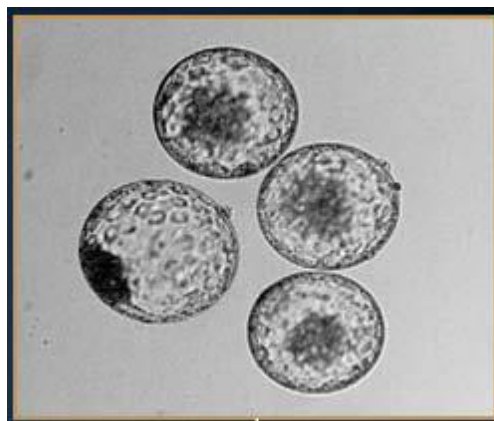
Estadío de 8-16 células



Mórula compacta.



Blastocisto- blastocisto expandido.





Blastocisto protruyendo.



Grafico 12. Estados embrionarios en periodo de cultivo.

(Fuente: Mucci, 2010)

5.4. DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES.

- **Embriones congelados con etilenglicol.**

1. Retirar la pajuela del N₂ líquido.

2. Exponer la pajuela al aire durante 5 segundos tomándola desde sus extremos. Con este procedimiento evitamos la ruptura del tapón de fábrica y la entrada de agua dentro de la pajuela durante la descongelación.

3. Introducción de las pajuelas en agua a 35°C durante 30 segundos.

4. Cortar el extremo opuesto al del tapón de fábrica y colocarla con este último hacia atrás en una pistola de transferencia (INTA, 2010).

- **EMBRIONES VITRIFICADOS MEDIANTE LA TECNICA OPS.**



1. Retirar las pajuelas del termo y colocarlas en un recipiente aislante conteniendo N_2 líquido.
2. Introducir el extremo de la pajuela directamente en una caja petri de 35mm cargada con 3ml de la solución 1 (cuadro 8) de calentamiento durante 3 minutos.
3. Posteriormente los embriones serán colocados 1 minuto en gotas de la solución 2 (cuadro 9) de calentamiento.
4. Pasando este tiempo los embriones serán lavados en PBS + suero al 20% mediante pasaje por gotas sobre cajas petri en donde permanecerán hasta el armado de las pajuelas para la transferencia.
5. Todas las maniobras se efectúan sobre platina térmica a $38.5^{\circ}C$ (INTA, 2010).

5.5. TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

Los embriones se transferirán quirúrgicamente realizando una laparotomía en la fosa paralumbar y con una pequeña incisión se depositara el embrión directamente en el útero, en la actualidad se transfiere por la vía no quirúrgica a través del cuello del útero depositando directamente el embrión en el cuerno ipsolateral donde se encontró ovulando la receptora (Hincapié, 2010).

✓ Técnica de transferencia no quirurgica transcervical.

1. Las vacas receptoras deben ser seleccionadas en el día 7 del ciclo estral (día 0= estro), detectándolo con o sin sincronización.



2. Los embriones se cosechan el día 7-8 después de la fertilización, se identifica en un microscopio y se transfieren los embriones de calidad excelente y buena.
3. Una vez realizado el examen rectal de la receptora y constatada la presencia de un cuerpo lúteo (CL) se inyecta una anestesia epidural baja (solución de xilocaína al 2%).
4. La región perineal y vulva se lavan con jabón desinfectante, agua y se secan.
5. El embrión es entonces colocado dentro de una pajuela esterilizada (0.25–0.5 ml) a la que se le ha cortado un extremo (aproximadamente 1.5 cm.), esto se realiza para que no se doble al ser introducida en el cérvix con lo consiguiente pérdida del embrión.
6. La colocación del embrión dentro de la pajuela se realiza de tal forma que el medio que posee el embrión quede entre 2 gotas de medio separadas por aire.
7. Posteriormente la pajuela con el embrión se coloca dentro de la pistola de transferencia y ésta dentro de la pipeta plástica que previamente ha sido esterilizada.
8. Con la mano izquierda el operador sujeta el cérvix a través de la pared del recto. La pipeta se introduce en el canal cervical y su extremo se ubica con ayuda de la mano izquierda en el cuerno ipsilateral al CL.
9. Una vez en la posición deseada (un poco más allá del cuerpo del útero) el embrión es depositado suavemente y la pistola se retira lentamente.
10. Todo este procedimiento debe realizarse lo más rápido y delicadamente posible. El exceso de manipulación producirá daño a la mucosa del útero que se traducirá en bajos resultados.



11. Aparte de la destreza y experiencia que son necesarias con cualquiera de las técnicas descritas, es necesario que las receptoras sean animales sanos, que sus ciclos reproductivos hayan sido normales y que estén en buen estado de nutrición.

12. En la medida que las receptoras estén en buenas condiciones tanto sanitarias como nutricionales y reproductivas, y la técnica sea bien realizada, la eficiencia de la transferencia de embriones traducida en preñeces será mayor (Hincapié, 2010).

III. CONCLUSIONES

La producción in vitro de embriones es una biotécnica con alto valor científico y productivo para la investigación y la producción animal.

De acuerdo a la literatura revisada hay dos métodos para la obtención de los ovocitos: Metodo transvaginal OPU (ovum pick up) y método de recolección de ovarios de vacas sacrificadas, ambos con punción folicular .

Se encontró que la técnica in vitro para obtención de embriones bovinos es una de las metodologías que actualmente está teniendo gran auge debido a la alta producción de embriones.

Existen diferentes medios de cultivo de acuerdo a las diferentes etapas de desarrollo del embrión.



Hay dos técnicas de criopreservación de embriones bovinos: vitrificación y congelación, de acuerdo a la literatura revisada la más recomendada es el método de congelación.

IV. LITERATURA CITADA.

Arlotto, T., Schwart, JL., Fist, NL., Leibfried, ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1996;45:943-956

Barros C. J., Leal. 1982. In vitro fertilization and its use to study gametes interactions, *in vitro* fertilization and embryo transfer. *En: HAFEZ, E.S. y SEMM, K.* 1982. International Medical Publishers. pp. 37-49

Betteridge K.J. 1981. An historical look at embryo transfer. *Journal Reproduction Fertility*, 62: 1-13.

Betteridge K.J. 2003. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal*



Bjerregaard B., Wrenzycki C., Philimonenko V.V., Hozac P., Laurincik J., Niemann H, et al. 2004. Regulation of ribosomal RNA synthesis during the final phases of porcine oocyte growth. *Biol Reprod.* 70:925-935.

Bols, P.E.J., Leroy, J.L.M.R., Vanholder T., Van soom, A. 2004. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*, v. 62, p. 906-914.

CELESTINOS M., y GATICA R. 2002. Vitricación como técnica de criopreservación de embriones bovinos. *Arch. Med. Vet*, 34(2): pp.157-165.

CNRG. 2014. centro nacional de recursos genéticos prácticas y apuntes

DÍEZ C., MUÑOZ M., CAAMAÑO J.N., GÓMEZ E. [con acceso el 2011 febrero 4] Biotecnologías reproductivas: Producción y Criopreservación de embriones in Vitro. *Tecnología agroalimentaria.* [Web en línea]. [2010] [41-46pag]. Disponible en URL:<http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>.

FERNÁNDEZ A., DÍAZ T., MUÑOZ G. 2007. Producción in vitro de embriones bovinos. *Rev. Fac. Cs. Vet*, 48(1):51-60.

FIRST, N.L., J.J. PARRISH. 1987. *In vitro* fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil.* 34 (Supl.): 151-170

GARDE J., LÓPEZ L., GALLEGO M. [con acceso el 2011 enero 15]. Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. [Web en línea]. [1996], [83-86pag]. Disponible en: URL:http://books.google.com/books?id=DzRV7xD5_QC&pg=PA84&dq=obtencionde+ovocitos+bovinos&hl=es&ei=zvmMTbu7IIIGatwfmkGcDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5&ved=0CDwQ6AEwBA#v=onepage&q&f=false



GIANNOTTI A. [con acceso el 2011 enero4]. Breve historia de la técnica de la fecundación in vitro para su uso en la cría de los animales. [Web en línea].

[1pag]. Disponible en:

URL:http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=24

GIBSON J.P., y SMITH C. 1989. The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies. In: Babiuk LA, ed. Comprehensive Biotechnology, First Ed. New York: Pergammon Press; 203-231.

HERNÁNDEZ H.F. [con acceso el 2011 febrero 20]. Fecundación in vitro.[Web en línea]. [2005]. [5pag]. Disponible

en:URL:http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manualganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf

HERRADÓN P.G., QUINTELA L.A., BECERRA J.J., RUIBAL S., FERNÁNDEZ M. [con acceso el 2011 febrero 18]. Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora Genética en Bovinos. [Web en línea]. [2007]. [8pag] Disponible en:

URL:http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2015%20Supl/p_herradon.pdf

HINCAPIÉ J. 2010. Memoria técnica curso de graduación: Preparación de las columnas de percoll. Honduras.

INTA, [con acceso el 2011 enero 24]. Aplicación de la de embriones en animal. [Web en línea]. [2004] [4pag]. Disponible en:

URL:<http://www.inta.gov.ar/expo/intaexpone/intaexpone04/charlas/saubidet/embrio.pdf> producción in vitro producción.



INTA, 2010 Junio. Memoria técnica curso de graduación: Producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos. Argentina, Balcarce: pp. 1-85.

KRUIP T.A.M., R. BONI, Y.A., WURTH, M.W.M., ROELOFSEN M.C. PIETERSE. 1994. Potencial use of ovum pick-up for embryo production and breeding cattle. *Theriogenology* 42: 675-684

MARCHAL R., VIGNERON C., PERREAU C., BALI-PAPP A., MERMILLOD P. 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. 57:1523-1532.

MOTLIK J., CROZET N., FULKA J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil*. 72:323-328.

MUCCI N, 2010. Memoria técnica curso de graduación: criopreservación de embriones bovinos, aspectos criobiológicos y técnicos. Balcarce, Buenos Aires.

MUCCI N, 2010. Memoria técnica curso de graduación: PIV de embriones bovinos aspectos técnicos y biológicos. Balcarce, Buenos Aires.

MUCCI N., ALLER J., CABODEVILA J., KÁISER J., HOZBOR F., ALBERIO R. 2006. Producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos: 2010 p. 1-10. *Arch. Med. Vet*, 38(2): pp.97-104.

MUÑOZ V.M.A. 2005. Fertilización *in vitro* en cerdos. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Posgrado en Biología Molecular. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. San Luis Potosí, SLP.

ÖZTURKLER Y. 2002. *In vitro* developmental potencial of electro-activated porcine oocytes collected by puncturation versus dissection. *Indian Vet J*. 79:327-330.



RUIZ L.S. [con acceso el 2011 febrero 4]. Ovum Pick Up en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. [Web en línea]. [2006] [6pag]. Disponible en URL:<http://es.scribd.com/doc/32729927/cys-31-58-63-OVUM-PICK-UP-OPU-en-bovinos-Aplicaciones-en-Biotecnologi%CC%81a-de-la-reproduccio%CC%81n>

SERIZIER A. [con acceso el 2011 febrero 13] Fecundación in vitro. [Web en línea]. [28pag]. Disponible en:URL:http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf

SMITH C. 1988. Applications of embryo transfer in animal breedings. Theriogenology; 29: 203-212.

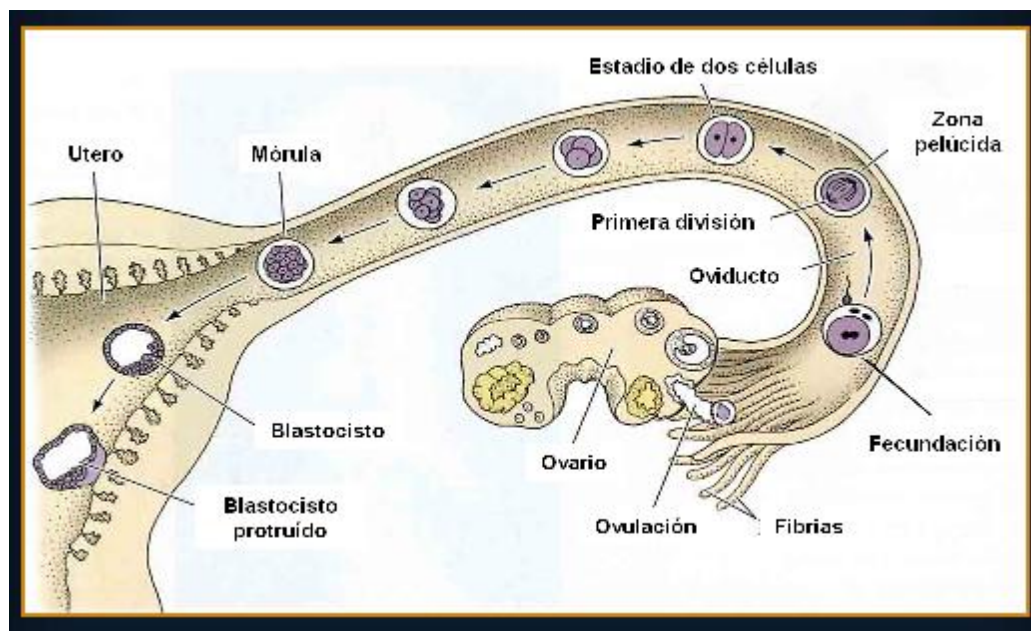
SMITH C. 1988. Genetic improvement of livestock using nucleus breeding units. World Animal Review, 65: 2-10

STRINGFELLOW D.A., SIEDEL. S.M. 2000. Manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones (I.E.T.S), 3ed, Alabama USA.

WU J., Emery B.R., CARRELL D.T. 2001. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. Biol Reprod. 64:375-381.

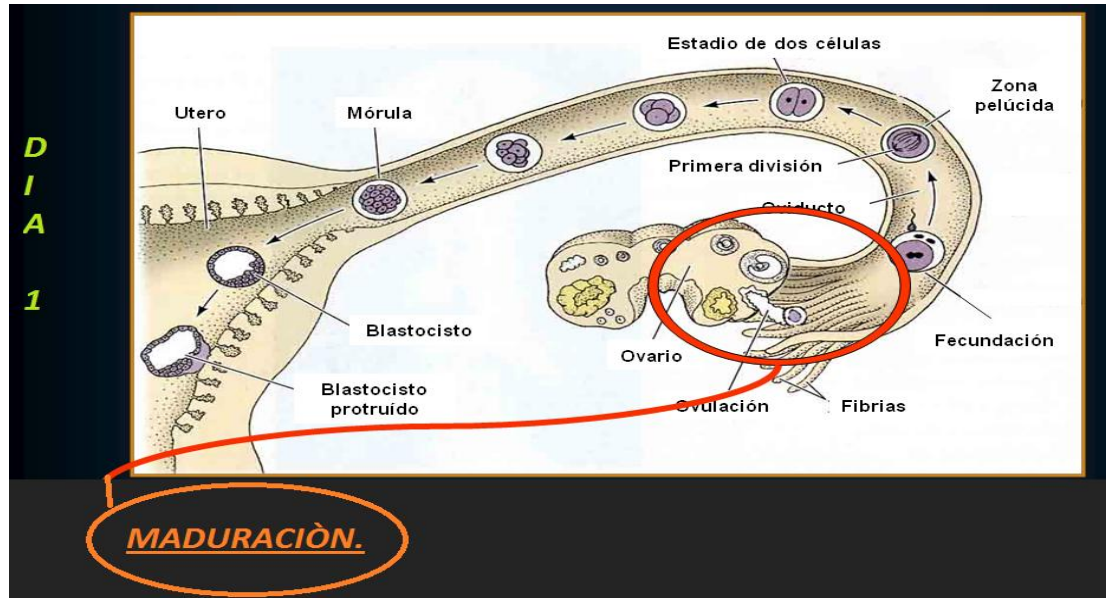
ZARATE O.E. 2006. Tesis: comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos; Veracruz. p.6.

V. ANEXOS

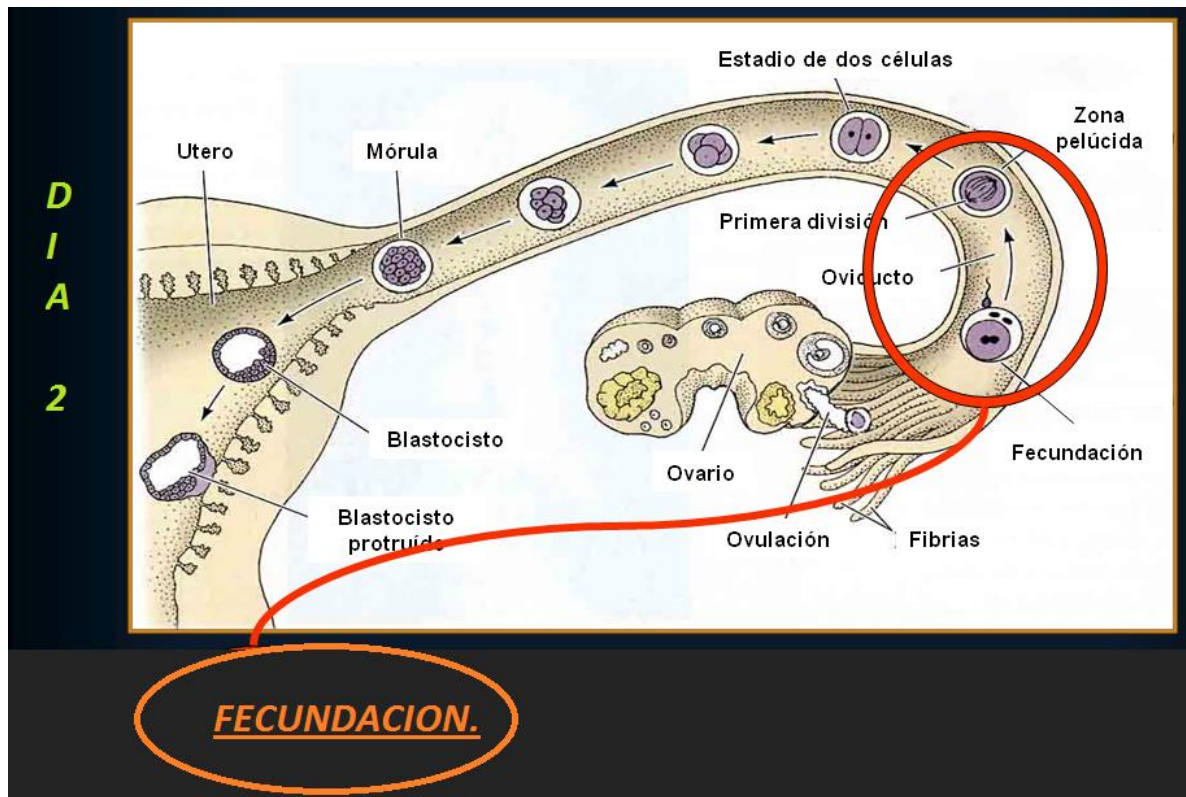


Anexo 1. Localización fisiológica de los embriones en el útero.

(Fuente: Mucci, 2010)



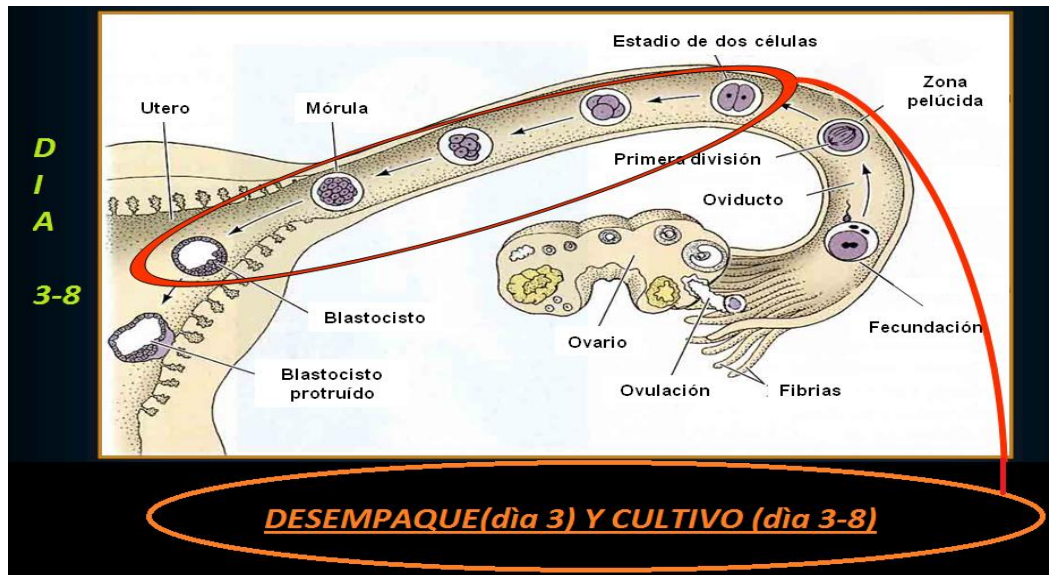
Anexo 2. Sitio donde se produce la obtención de los ovocitos (día 1).
(Fuente: Mucci, 2010)



Anexo 3. Lugar donde en condiciones normales se realizaría la fecundación.



(Fuente: Mucci, 2010)



Anexo 4. Secuencia de cambios en los embriones que se imitan en el laboratorio (Fuente: Mucci, 2010).