



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y

ZOOTECNIA



TIEMPO DE TRANSPORTE SOBRE LA PRODUCCION DE

EMBRIONES IN VITRO EN VACUNOS

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. MARY ESTHER CAYLLAHUA HUANACO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2020



DEDICATORIA

*A DIOS: por permitirme seguir
con vida y darme las fuerzas
para seguir adelante.*

*A MIS PADRES: Fernando y
Juana Justina , por el amor y
apoyo brindado en todo
momento, por enseñarme que
todo lo que uno se propone lo
logra con esfuerzo y
dedicación, por ser un ejemplo
a seguir, gracias a ellos he
logrado una meta más en mi
vida.*

*A MI HIJO: Daniel, por haber
llegado a mi vida, por ser la
inspiración, fuerza y motivo
para salir adelante, por
llenarme de felicidad y
sacarme una sonrisa a diario.*

*A MIS HERMANOS: Rolando,
Beatriz, Elizabeth y Víctor, por
orientarme con sus palabras
mágicas y enseñarme que una
caída no es una derrota sino el
principio de una lucha que
siempre termina en logros y
éxitos.*

*A SAINT: Por la paciencia
mostrada y la motivación de
seguir adelante*



AGRADECIMIENTO

- Primero, agradecer con todo mi corazón a Dios por hacer realidad mis sueños
- A la Universidad Nacional del Altiplano, por ser el alma mater para mi formación profesional
- A la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarme sus aulas y laboratorios para formarme profesional
- A los docentes de la FMVZ, por impartirme sus enseñanzas necesarias para mi formación profesional
- Al personal que labora en general de la FMVZ, por las facilidades brindadas para la culminación de mi carrera profesional
- Al laboratorio de Reproducción animal de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme brindado las facilidades para el desarrollo de la tesis
- AL Dr. Manuel Guido Pérez Durand, mi eterno agradecimiento, respeto y admiración por los conocimientos impartidos y su acertada dirección, desde el inicio de mi proyecto hasta la culminación de la presente tesis.
- Al MVZ. Darwin Arque, por haberme orientado en la ejecución del presente trabajo de investigación y la paciencia mostrada.
- A mis jurados de tesis Dr. Ceferino Olarte; M.sc. Rolando Rojas; Dra. Nubia Catacora, por la orientación y los conocimientos impartidos
- A Saint por el apoyo brindado pese a los diferentes obstáculos.
- A mis amigos de laboratorio Madeleyne y David quienes me brindaron su amistad y apoyo en la ejecución del presente trabajo



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN..... 11

ABSTRACT..... 12

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVOS..... 14

1.1.1 OBJETIVO GENERAL..... 14

1.1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 14

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 OVOGÉNESIS 15

2.1.1 Ovocitos primarios..... 15

2.1.2 Ovocito secundario. 16

2.2 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO 16

2.2.1 Obtención de ovocitos 16

2.2.2 Clasificación de los ovocitos 19

2.2.3 Maduración del ovocito 20

2.2.4 Medios de maduración..... 22

2.2.5 Fertilización in vitro 22

2.2.6 Desarrollo embrionario temprano..... 25

2.2.7 Cultivo in vitro de embriones 26

2.3 MEDIO DE CULTIVO FLUIDO TUBAL HUMANO (HTF)..... 27

2.4 ANTECEDENTES 28



CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO	32
3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL	32
3.3 METODOLOGÍA	33
3.3.1 Preparación de la cámara de incubación portátil de CO ₂	33
3.3.2 Preparación y equilibrio del medio de maduración y cultivo de embriones.	33
3.3.3 Preparación y equilibrio de medio de transporte	34
3.3.4 Obtención de ovocitos	34
3.3.5 Simulación de transporte de los ovocitos	35
3.3.6 Maduración de ovocitos.....	36
3.3.7 Fertilización in vitro	36
3.3.8 Cultivo de los embriones y evaluación	39
3.3.9 Grupo control.....	39
3.4 ANALISIS ESTADÍSTICO	40

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DE FERTILIZACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS TRANSPORTADOS POR 4, 8 Y 12 HORAS EN MEDIO HTF	41
4.2 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES PROVENIENTES DE TRANSPORTE EN MEDIO HTF POR 4, 8 Y 12 HORAS	45
V. CONCLUSIONES	48
VI. RECOMENDACIONES	49
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA	50
ANEXOS	58

Área : Reproducción animal

Tema: Transporte de embriones in vitro en bovino

Fecha de sustentación: 09 de enero de 2020



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte de ovarios a 35 °C, en solución salina y antibioticos.....	70
Figura 2. Lavado y preparación de ovarios para la aspiración folicular.....	70
Figura 3. Foliculos de mayores de 3mm para aspiración folicular.....	71
Figura 4. Preparación de materiales y medio de transporte.....	71
Figura 5. Esterilización y preparación de materiales.....	72
Figura 6. Medio de transporte HTF, en crioviales.....	72
Figura 7. Transporte de ovocitos en medio HTF, sumergidos en baño maria.....	73
Figura 8. Ovocitos maduros con células de cúmulos oophorus con expansión y elasticidad completando las 24 horas.....	73
Figura 9. Evaluación de división celular post fertilización (Embrión de 2 células).....	74
Figura 10. Embrión de 4 células	74
Figura 11. Embrión de 8 células	75
Figura 12. Mórula	75
Figura 13. Blastocisto	76
Figura 14. Cámara portátil de producción de embriones FIV	76



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Porcentaje de fertilización de ovocitos transportados por 4, 8 y 12 h al	42
Tabla2. Porcentaje de producción de embriones provenientes de ovocitos transportados por 4, 8 y 12 h en medio HTF.	45



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Categorías de ovocitos según características de células de cumulus y citoplasma	20
Cuadro 2.	Composición del medio HTF.....	27
Cuadro 3.	Distribución de los ovocitos transportados (HTF) en diferentes tiempos para la producción de embriones in vitro.....	32
Cuadro 4.	Desarrollo embrionario en 4 horas de transporte en medio HTF	59
Cuadro 5.	Porcentaje de fertilización al 3 y 7 día en 8h de transporte	59
Cuadro 6.	Porcentaje de fertilización al 3 y 7 día en 12 h de transporte	60
Cuadro 7.	Producción in vitro de embriones a los 3 días de fertilización	60
Cuadro 8.	Producción in vitro de embriones a los 7 días de fertilización	61
Cuadro 9.	Resumen del procesamiento de los casos para fertilización.....	62
Cuadro 10.	Cuadro de contingencia de Fertilización * Tiempo de transporte	62
Cuadro 11.	Pruebas de chi-cuadrado para fertilización según tiempos de transporte .	63
Cuadro 12.	Resumen del procesamiento de los casos para desarrollo embrionario....	63
Cuadro 13.	Cuadro de contingencia Desarrollo embrionario * Tiempo de transporte	64
Cuadro 14.	Pruebas de chi-cuadrado	65



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- IVM: Maduración in vitro.
- ZP: Zona pelúcida.
- PIV: fertilización
- COCs : Complejo *cúmulus*-ovocito
- FIV: Fertilización in vitro
- HTF: Fluido oviductal humano
- BSA: Albúmina sérica bovina./ BSAf: Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos.
- PBS: solución buffer de fosfato
- PIV: producción in vitro de embriones
- SOF: Fluido oviductal sintético.
- SOFaa: SOF sin BSA, con aminoácidos.
- TCM-199: Medio de cultivo de tejidos 199.
- STL: Medio Tyrode modificado, utilizado para la separación de los espermatozoides mediante “swim-up”.
- PBS = Solución Buffer Fosfato Salino
- PHE = Penicilamina, hipotaurina, epinafrina
- SPERM-TALP = Medio de capacitación espermática TALP
- SVC = Suero de vaca en celo
- TALP = Tyrode’s Albúmina-Lactato-Piruvato



RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicada a una altitud de 3820 msnm. Siendo el objetivo, determinar la tasa de fertilización *in vitro* de ovocitos de bovino transportados en diferentes tiempos (4, 8 y 12 h) en el medio fluido tubal humano (HTF), determinar la producción *in vitro* de embriones bovinos de ovocitos transportados en diferentes tiempos (4, 8 y 12 h) en el medio fluido tubal humano (HTF). El protocolo de producción de embriones utilizado corresponde al ya establecido en el laboratorio de reproducción animal de la FMVZ. La simulación de transporte se realizó en viales de 1.5 mL con medio HTF suplementado (eCG, hCG, SFB), los cuales se sumergieron en baño maría según tratamiento (4, 8 y 12 horas), para luego ser transportadas a incubación convencional para completar la maduración ovocitaria. La fertilización se realizó en medio Fert TALP por 18 horas con espermatozoides previamente sometidos a swim up. Posterior a la fertilización se procedió al vortezado y lavado de los presuntos cigotos, para finalmente ser cultivados por 7 días en medio SOFaa. Los resultados para fertilización fueron 35.96%, 26.64%, 16.75% y 44.02% para los tratamientos 4, 8, 12 y control respectivamente ($p < 0.05$). En producción de embriones se obtuvo 21.18%, 12.66%, 15.68% y 28.11% para transporte de 4, 8, 12 y control respectivamente, destacando que existe dependencia de la producción de embriones por influencia del tiempo de transporte ($p < 0.05$). Se concluye que el efecto del tiempo de transporte influye negativamente en la producción de embriones por fertilización *in vitro*.

Palabras Clave: Desarrollo embrionario, fluido tubal humano, *In vitro*, transporte.



ABSTRACT

This research work was carried out in the Animal Reproduction laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of the Altiplano, located at an altitude of 3820 meters above sea level. The objective being to determine the *in vitro* fertilization rate of bovine oocytes transported at different times (4, 8 and 12 h) in the human tubal fluid medium (HTF), to determine the *in vitro* production of bovine embryos of oocytes transported in different times (4, 8 and 12 h) in human tubal fluid medium (HTF). The embryo production protocol used corresponds to the one already established in the FMVZ animal reproduction laboratory. The transport simulation was carried out in 1.5 mL vials with supplemented HTF medium (eCG, hCG, SFB), which were immersed in a water bath according to treatment (4, 8 and 12 hours), to then be transported to conventional incubation for the completion of oocyte maturation. Fertilization was carried out in Fert TALP medium for 18 hours with sperm previously subjected to swim up. After fertilization, the presumed zygotes were vortexed and washed, to finally be cultured for 7 days in SOFaa medium. Results for fertilization of 35.96%, 26.64%, 16.75% and 44.02% were obtained for treatments 4, 8, 12 and control respectively. In embryo production, 21.18%, 12.66%, 15.68% and 28.11% were obtained for transport of 4, 8, 12 and control respectively, highlighting that there is dependence on embryo production due to the influence of transport time ($p < 0.05$). It is concluded that the effect of transport time negatively influences the production of embryos by *in vitro* fertilization.

Key words: Embryonic development human tubal fluid, *In vitro*, transport.



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

En el departamento de Puno la mayor parte de la población de ganado vacuno está en manos de pequeños productores, por consiguiente la ganadería es la principal actividad económica de la población puneña, la crianza de ganado vacuno presenta una importante dinámica de competitividad en términos del mercado nacional, que refleja en su participación en los principales mercados de la costa (INEI, 2013). La producción pecuaria en la actualidad es el sector con mayor crecimiento debido al incremento en la demanda de productos de origen animal principalmente en países desarrollados (Ruane y Zimmermann, 2003).

La producción *in vitro* de embriones (PIV) bovinos se divide en tres etapas: la maduración de ovocitos, la fertilización de ovocitos maduros y el cultivo de embriones. Estas etapas comprenden una serie de procesos fisiológicos, cada uno de los cuales condiciona el éxito o fracaso del proceso (Mucci et al., 2006).

Para la producción *in vitro* de embriones bovinos (PIV), los ovocitos pueden obtenerse de ovarios procedentes de mataderos o animales vivos, laparoscopia o por aspiración folicular transvaginal (OPU). Hay avances en las técnicas de recuperación de ovocitos, pero existen pocos estudios sobre el transporte de ovocitos al laboratorio (Ward et al., 2000)

Los medios de cultivo y suplementos utilizados para el transporte y la maduración de los ovocitos recuperados son extremadamente importantes porque deben proporcionar condiciones de cultivo adecuadas y minimizar los efectos ambientales adversos, como las variaciones en el pH y la mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (



Lonergan, 2000). En la actualidad, los tipos de medios que se utilizan, se clasifican en simples y complejos: los simples como el HTF, está destinada para uso como medio de cultivo hasta el día 3 de desarrollo del embrión humano, así como para el procesamiento de gametos. El HTF utiliza bicarbonato sódico como sistema tampón (Quinn et al., 1985)

La distancia que existe entre el sitio de obtención de ovocitos y los centros de producción *in vitro* de embriones viene hacer problema, por lo cual se necesita las condiciones óptimas para mantener a los ovocitos viables durante el transporte al laboratorio PIVE, ya que su calidad intrínseca es un factor determinante en el desarrollo embrionario temprano.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL.

- Determinar la fertilización de ovocitos y la producción *in vitro* de embriones bovinos de ovocitos transportados en diferentes tiempos (4,8 y 12 h) en el medio fluido tubal humano (HTF)

1.1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar la tasa de fertilización *in vitro* de ovocitos de bovino transportados en diferentes tiempos (4 ,8 y 12 h) en el medio fluido tubal humano (HTF).
- Determinar la producción *in vitro* de embriones bovinos de ovocitos transportados en diferentes tiempos (4 ,8 y 12 h) en el medio fluido tubal humano (HTF).



CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 OVOGÉNESIS

Los ovocitos se originan como células germinales primordiales del endodermo del saco vitelino embrionario, migran por movimientos ameboides a través del mesenterio dorsal del intestino posterior a la cresta gonadal aproximadamente al día 35 de gestación en los bovinos; estas Células germinales primordiales están sometidas a un número limitado de divisiones mitóticas durante la migración hasta llegar a la cresta gonadal a través de su epitelio superficial, durante este proceso cesan las divisiones mitóticas y forman cordones de células germinales encerrados por células epiteliales; estos cordones están delimitados por las células mesenquimales formando una lámina basal dando origen a las denominadas ovogonias (Adams et al., 2008)

Las ovogonias entran en meiosis convirtiéndose en ovocitos primarios, a causa de la acción de una sustancia inductora de la meiosis proveniente de las células embrionarias, la meiosis se detendrá en dos tiempos: alrededor del nacimiento y en la ovulación y sólo se completará totalmente al producirse la fecundación del ovocito. El proceso de la división meiótica consta de dos divisiones como meiosis I y II, divididas a su vez en cuatro fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase, indicando con los términos I y II su correspondencia a una u otra división (Franchi et al., 1962).

2.1.1 Ovocitos primarios.

En esta etapa ocurre dos divisiones llamadas meiosis de reducción de número de cromosomas, este proceso es interrumpido por dos fases de inactividad; en donde en la primera interrupción es en la profase I de la



primera división meiotica y la segunda en metafase II de la segunda división meiotica, así el ovocito primario da comienzo la primera división meiotica, en donde el ADN se replicado y cada cromosoma se constituye de dos cromatidas (Galina y Valencia, 2008).

2.1.2 Ovocito secundario.

En esta etapa cada uno de los cromosomas aún está compuesto por dos cromatidas que solamente se separan en la división meiosis II. Después de la separación de los cromosomas en la anafase II, el citoplasma del ovocito secundario se divide nuevamente produciendo el ovulo maduro y un segundo corpúsculo polar (Adams et al., 2008). Casi en todas de las especies, la maduración de los ovocitos llega hasta la metafase II (ovulación) entrando en reposo hasta el momento de la fertilización, cuando el espermatozoide ingresa activa el ovulo para completar la meiosis (Galina y Valencia, 2008).

2.2 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO

Esta biotecnología consta de las siguientes etapas principales; obtención de ovocitos, maduración in vitro, fecundación de ovocitos y cultivo in vitro de embriones.

2.2.1 Obtención de ovocitos

Existen diferentes técnicas de obtención de ovocitos ya sea en animales muertos o en animales vivos; la obtención de ovocitos de animales muertos se hace mediante la recolección de ovarios de vacas sacrificadas, esta técnica es una fuente más utilizada de bajo costo, provenientes de animales en diferentes estados del ciclo estral, que pueden ser madurados, crio



preservados, fertilizados y cultivados in vitro hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario (Gordon, 1996)

2.2.1.1 Recolección de ovarios en los camales

En los matadero la recolección de ovarios se realiza mediante la intervención del recolector inicio de la cadena de matanza, los ovarios se obtienen de vacas en diferentes estados fisiológicos dentro de un rango de 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales, al recogerlos son colocados en un termo que contiene solución salina (0.9% NaCL), o solución fosfato-tamponada salina (PBS) (Aller et al., 2015). Estas soluciones contienen generalmente, como antibióticos 25 mg/L de kanamicina, o 100 UI/L de penicilina y 100 ug/L de gentamicina (Leibfried y First, 1979)

El traslado de los ovarios del mataderos al laboratorio, se realiza desde los 30 min a las 6 h. después de la recolección a una temperatura de 30-35°C, ya en el laboratorio los ovarios son lavados repetidas veces en la solución de transporte, luego son colocados en baño maría a 30°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos (Fry et al., 1997). Existen diversas técnicas para obtener ovocitos de ovarios provenientes de mataderos.

a) Disección folicular

Se selecciona ovarios que presenten folículos entre 2 y 8 mm, para la recuperación ovocitos, se requiere la disección de los folículos antrales intactos seguidos de una ruptura cuidadosa y controlada de los folículos sugeridos permitiendo obtener ovocitos



morfológicamente aceptables con una mínima destrucción de las células del cumulus (Gordon, 1996)

b) Cortes ováricos.

Esta técnica de cortes o slicing ovárico se puede aplicar directamente sobre los ovarios o aplicarla después de completar una aspiración pudiendo obtenerse el triple de ovocitos con relación a la técnica de aspiración folicular; en varias investigaciones se pudo concluir que esta técnica fue el mejor método para obtener grandes cantidades de ovocitos de ovarios de matadero, debido a que al cortar transversalmente el ovario no solo se obtienen las ovocitos de la superficie, sino que también se obtienen los ovocitos presentes en la sección cortical (Crocomo et al., 2012).

c) Aspiración folicular

Es la técnica más empleada en la recuperación ovocitaria en ovarios de matadero; sin embargo, se sabe que de todos los folículos aspirados sólo se recupera el 30 o 60% de ovocitos (Gordon, 1996). La ventaja de la absorción folicular se basa en la velocidad y la facilidad operacional, factor particularmente importante en una unidad comercial de producción de embriones, puede realizarse con agujas 18 a 22 G unidas con jeringas de 3 o 10mL (Sasamoto et al., 2003).

d) Aspiración ovárica ayudada por transiluminación

Esta técnica asocia la aspiración folicular comúnmente conocida y el empleo de la luz guiada a través de una barra de



plexiglás insertado en el hilus del ovario. Permite iluminar no solo los folículos presentes en la superficie del ovario, sino también los presentes en la corteza del ovario, pudiendo aumentar el número de ovocitos colectados hasta un 50% por ovario, además los ovocitos obtenidos por esta técnica muestran un eficiente desarrollo in vitro (Arav, 2001).

2.2.2 Clasificación de los ovocitos

El primer método para clasificar entre ovocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario es la calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito (células del cumulus ophorus) y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que el ovocito posee para la maduración y fertilización in vitro (Leibfried y First, 1979).

Las células del cúmulo son subpoblaciones de células de la granulosa las cuales proveen de nutrientes al ovocito durante el crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Arlotto et al., 1996).

Los laboratorios establecen un tipo de clasificación para los ovocitos recuperados que se van a someter a procedimientos in vitro, pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células de los cúmulos y la apariencia del citoplasma. De las siguientes categorías en general se considera que solamente los ovocitos tipo A y B poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por FIV (Lonergan et al., 1994)

Cuadro 1. Categorías de ovocitos según características de células de cumulus y citoplasma

TIPO	N° de células Cumulus	Citoplasma
A	Capas múltiples, compactas de cél. de cumulus (> 4).	Homogéneo y transparente
B	Capas múltiples, compactas de cél. de cumulus (1 a 3).	Homogéneo con zonas periféricas oscuras.
C	Desnudados	Irregular con zonas oscuras.
D	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras.

Fuente: Lonergan et al. 1994.

2.2.3 Maduración del ovocito

Se divide en maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Martínez, 2002). El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial de LH, además de la reanudación de la meiosis, el pico de la LH desencadena cambios en el complejo *cúmulus*-ovocito (COCs) (Conti et al., 2006).

2.2.3.1 Maduración citoplasmática

Es un proceso donde ocurren cambios en el gameto femenino, que le confiere la capacidad para mantener viables los eventos de fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario (Vanhoutte, 2009).

Se afirma que la maduración citoplasmática se lleva a cabo mediante la redistribución de las organelas citoplasmáticas, los cambios en la dinámica de los filamentos del citoesqueleto y una



reprogramación de la síntesis proteica, así también la redistribución de las mitocondrias en la región periférica al citoplasma interno, una falla en esta redistribución produce una incompleta maduración citoplasmática y una reducción en el desarrollo de la competencia (Liu et al., 2010).

Sin embargo existen sucesos que pueden influir en el éxito de la MIV tales como: las condiciones de cultivo que no son capaces de sustentar la expresión de factores intrínsecos del desarrollo del ovocito; los sistemas actuales de MIV que pueden inducir una asincronía en el progreso de la maduración nuclear y citoplasmática; o que el ovocito no tiene uno o más de los componentes necesarios para la maduración nuclear y citoplasmática (Reyes et al., 2010).

2.2.3.2 Maduración nuclear

La maduración nuclear empieza con la reanudación de la meiosis, dándose el paso de vesícula germinal (VG) a metafase de la segunda división meiótica (MII) esta conlleva a la disolución de la membrana nuclear conocida como “rotura de la vesícula germinal”, la formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I (MI); para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la formación del primer corpúsculo polar (CP) y el paso del ovocito al estadio de MII (Richard, 2007). La maduración nuclear culmina con la fusión de membranas entre el ovocito y el



espermatozoide dando origen a la formación de los pronúcleos masculino y femenino (Gordon, 2003).

2.2.4 Medios de maduración.

Los medios de maduración deben reunir ciertas características para que la maduración se lleve a cabo de forma correcta, simulando las condiciones que el ovocito encontraría in vivo, para conseguir esto se utilizan distintos medios de maduración; uno de los más usados es el TCM-199, aunque también existen otros como el TALP, el B2 de Menezo que se adicionan con una serie de suplementos, siendo la acción de cada uno diferente, aunque todos persiguen el mismo fin (Dieleman et al., 2002).

2.2.5 Fertilización in vitro

Después de la maduración *in vitro*, los ovocitos se encuentran aptos para ser fertilizados *in vitro*; previo a la fertilización de los ovocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este penetrar y fecundar a los ovocitos (Shemesh et al., 2000).

2.2.5.1 Preparación del semen

Generalmente el semen utilizado para la fertilización *in vitro* procede de semen congelado, por tanto la preparación incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crioprotectores, la separación de los espermatozoides móviles de los no móviles y la capacitación espermática (Parrish et al., 1988; Avery y Greve, 1995).



a) Lavado del semen y separación de espermatozoides motiles y no motiles.

Existen metodologías descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y estas son: Swim-up, gradiente de Percoll, lavado por centrifugación, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación; siendo el lavado por centrifugación el método más sencillo de todos (Risopatrón et al., 1996)

b) Capacitación de los espermatozoides.

La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica (Avery y Greve, 1995). En éste proceso se produce retiro del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide dejando libres a los receptores que interaccionan con las células del cúmulus, incremento del pH acrosomal, desequilibrio entre el colesterol y fosfolípidos y aumento en la permeabilidad al calcio (Shemesh et al., 2000). Para capacitar los espermatozoides, se emplean medios compuestos con heparina, calcio, células del epitelio oviductal y fosfolípidos vasoactivos; donde la heparina capacita a las células espermáticas, mediante el desplazamiento de las proteínas descapacitantes de la membrana plasmática y la estimulación de la apertura de los canales de calcio (Salisbury et al., 1978).

2.2.5.2 Eventos durante la fecundación *in vitro*

La fecundación es la interacción celular entre los gametos, que se unen para generar un nuevo individuo con un genoma derivado de



ambos padres, llevándose este en varios eventos de cascada (Gilbert, 2005).

La zona pelucida contiene tres proteínas (ZP1, ZP2, ZP3), quienes actúan como receptores primarios y secundarios para que se dé la unión entre el ovocito y el espermatozoide; en primera instancia para la unión de gametos, la ZP3 se une al espermatozoide, produciéndose una reacción primaria, de tal manera que esto provoca la reacción acrosómica, donde la membrana acrosomal externa del espermatozoide se une con la membrana plasmática del ovocito, enseguida la membrana acrosomal interna interactúa con la proteína ZP2 produciendo así una reacción secundaria, activándose los espermatozoides liberando calcio intracelular, que lleva a la liberación de vesículas acrosómicas que contienen hialuronidasa y acrosina, estas enzimas permiten al espermatozoide atravesar la ZP, llegando al espacio perivitelino, donde la membrana plasmática post-acrosomal se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, y de esta manera el espermatozoide se incorpora al citoplasma (Sepúlveda, 2008).

El tiempo habitual de FIV ocurre entre 18 h y 24 h, donde se ha visto resultados satisfactorios, la unión de los espermatozoides activa al ovocito, completando la MII y expulsando el segundo CP, a partir del material genético haploide del espermatozoide y del ovocito se van a formar los pronúcleos, que migran al centro de la célula, donde el ADN se duplica y ocurre la singamia, rompiéndose la membrana de los pronúcleos y por consiguiente los cromosomas se



ensamblan en el huso mitótico, tornándose así el primer clivaje del nuevo individuo (Boiso et al., 2003).

2.2.6 Desarrollo embrionario temprano

La segmentación o división embrionaria es un proceso después de la fecundación, los cigotos experimentan varias divisiones mitóticas, esta secuencia de duplicaciones continúa durante el resto del periodo de segmentación temprana, una vez que el embrión ha formado 16 blastómeros, se denomina mórula (Hafez, 2002).

- a) **La mórula compacta**, es visible al quinto y sexto día de cultivo, donde el número de blastómeros es de aproximadamente de 32-64, los blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa solo el 60-70% del espacio perivitelino, durante esta etapa las células embrionarias cambian de esférica a una forma poligonal, a este fenómeno se denomina compactación, donde las células pueden comunicarse entre sí mediante uniones especiales, la compactación es una excelente señal de que el embrión se está desarrollando normalmente (Seidel y Meare, 2013)
- b) **El blastocisto temprano**, es visible a los siete días, el número de blastómeros es de 100-200 células; se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas o trofoblasto y por la formación de una cavidad llamada blastocele en el interior del embrión (Palma, 2001).
- c) **El blastocisto expandido**, visible entre al día siete y ocho del cultivo, con más de 200 células, el diámetro aumenta considerablemente, con el consecuente adelgazamiento de la zona pelúcida; la presión



creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su protrusión (Palma, 2001)

d) El blastocisto protruido, visible al día ocho y nueve, con 200 a 800 células, los embriones han abandonado la zona pelúcida, puede ser esférica, con un blastocele bien definido o colapsado. Los blastocistos protruidos pueden ser igualmente transferidos, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos, razón por la cual se acostumbra a transferir estadios de mórulas compactas a blastocistos (Palma, 2001)

2.2.7 Cultivo in vitro de embriones

Durante los días de desarrollo embrionario se realiza la evaluación en cada etapa, la cantidad evolucionada de embriones depende del estado de desarrollo de los mismos y estos a la vez con su medio de desarrollo (Palma, 2001). Para obtener un buen cultivo de embriones es esencial conocer los medios de cultivo que de acuerdo a sus características se clasifican en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y cocultivo con células somáticas; semidefinidos, cuando se omite el cocultivo 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 (Herradón et al., 2007)

Los medios simples más utilizados para el cultivo de los embriones bovinos son: fluido oviductal sintético, con base a los componentes encontrados en el fluido oviductal ovino y Potassium Simplex Optimized Medium KSOM (Liu y Foote 1995)



2.3 MEDIO DE CULTIVO FLUIDO TUBAL HUMANO (HTF)

El HTF es una solución sintética y definida para su uso como medio de cultivo hasta el día 3 de desarrollo del embrión humano, así como para el procesamiento de gametos, el HTF utiliza bicarbonato sódico como sistema tampón. La formulación de HTF se basó en la composición química conocida de los fluidos en las trompas de Falopio humanas, que imita el entorno in vivo (Quinn et al., 1985)

Cuadro 2. Composición del medio HTF

Sales e iones	Cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato magnésico, fosfato potásico, cloruro cálcico
Sistemas tampón	Bicarbonato sódico
Fuentes de energía	Glucosa, Piruvato sódico, Lactato sódico
Antibiótico	Sulfato de gentamicina
Indicador del pH	Rojo fenol



2.4 ANTECEDENTES

En un estudio de producción in vitro de embriones bovinos, obtuvieron una tasa de fertilización in vitro de acuerdo a las características morfológicas del ovocitos a madurar son, que los ovocitos que presentan más de seis capas de células (categoría A) presentaron una tasa de fertilización 72%, una tasa de desarrollo embrionario de 35.1%, 14% de mórulas y ningún blastocisto. En el grupo de ovocitos rodeados de cuatro a seis capas de células(categoría B) muestran una tasa de fertilización de 81 .8%, una tasa de división embrionaria de 46.3% ,20.8% de mórula y 3,3% de blastocistos Con respecto a los ovocitos que presentan para el momento de la maduración de dos a tres capas de células(categoría C) se alcanzó una tasa de fertilización de 76.9%. La tasa de división embrionaria obtenida fue de 36,8%, 13,1% de mórulas y 2,6% de blastocistos al final del cultivo. En contraste con los ovocitos madurados que presentan muy pocas células del cúmulus alrededor o están desnudos, estos presentan una tasa de fertilización mucho menor en el orden del 55,7%, así como una tasa de desarrollo embrionario de 14,7%, de mórulas 1% y ningún blastocisto; utilizaron el medio HTF para la maduración y fertilización de los ovocitos (Fernández et al., 2007)

En otro trabajo presentaron ovocitos bovinos con 89,7% (1.308 ovocitos madurados y 1.458 ovocitos colectados). La tasa de división (porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de cuatro o más células del total de ovocitos fertilizados in vitro) fue 82,3% para ovocitos cultivados en KSOM y 80,1% para ovocitos cultivados en medio HTF. La tasa de desarrollo de blastocistos (porcentaje de blastocistos obtenidos del total de ovocitos fertilizados in vitro) fue 31,6% para embriones cultivados en KSOM y 29,5% para embriones cultivados en HTF modificado (Ahuja et al., 2009)

En el Laboratorio de Reproducción Animal de la Esculela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras .Aspiraron 36 ovarios de matadero de los cuales se extrajeron, por el



método de aspiración folicular, 241 ovocitos, de estos 90(37.34%) se clasificaron como degenerados y 151(62.66%) fueron viables, resultando un promedio de 4.03 ovocitos viables por ovario; los 151 ovocitos fueron sometidos al medio de maduración TCM199 + P/S, posteriormente fueron incubados a 2 gases (5% CO₂, 5% O₂) a 38.5°C durante 24 h, como resultado 11 (74.17%) presentaron expansión de las células del cumulus oophorus y 39(25.83%) no maduraron; el total de ovocitos madurados fueron fertilizados utilizando el medio Heparina porcina+PHE e incubados a 2 gases durante 18 h, obteniendo 88(78.57%) ovocitos fertilizados y 24(21.43%) no fertilizados; los 88 ovocitos fertilizados fueron cultivados en el medio SOF obteniendo 53(60.20%) ovocitos con división celular (clivaje) y 35(39.80%) ovocitos con muerte celular (apoptosis), obteniendo 30(56.60%) blastocistos al séptimo día (Crespo y Huaman , 2015)

Aspiraron 69 ovarios de matadero de los cuales se extrajeron 444 ovocitos, 152 (34.23%) se clasificaron como degenerados y 292 (65.76%) fueron viables, dando un promedio de 4.2 ovocitos viables por ovario; de los 292 ovocitos viables se maduraron 232 (79.45%) presentando una expansión de las células del cumulus oophorus y 60 (20.55%) no maduraron; del total de ovocitos madurados 101 (43.53%) fueron fertilizados y 131 (56.46%) no fueron fertilizados; de los 101 ovocitos fertilizados 56 (55.4%) presentaron división celular (clivaje) y 45 (44.5%) estuvieron en muerte celular (apoptosis), obteniendo 30 (53.57%) blastocistos al séptimo día (García y Martínez 2013).

Por otro lado, en un estudio realizado, muestra los embriones viables y el estadio embrionario alcanzado al séptimo día de CIV, donde se determinó que tanto los cigotos cultivados con el sistema de cocultivo así como sin él, lograron llegar hasta el estadio de mórula, blastocisto inicial, blastocisto y blastocisto expandido (25.7%-20.4%, 20.6%-22%, 5%-7.3%, 2.1%-1.4%; respectivamente). De igual modo el porcentaje de embriones degenerados fue de 46.6% y 48.9%, respectivamente (Guevara, 2017).



En el laboratorio de embriología clínica, Valencia, España compararon dos medios de cultivo embrionario: HTF y ISM-1, a nivel de desarrollo embrionario hasta blastocisto. Un total de 1022 ovocitos fueron incluidos en el estudio donde se utilizó 455 ovocitos para el medio HTF y el medio ISM-1 567 ovocitos .obteniendo resultados de tasas de fecundación obtenidas tras la utilización de HTF o ISM-1 fueron del 69,6% y del 72,5% y para el desarrollo embrionario 57,4% (50/87) de los embriones del grupo HTF/CCM llegaron al estadio de blastocisto mientras que un 37% (39/105) de los embriones llegaron a blastocisto en el grupo ISM-1/ISM-2, resultando diferencia estadísticamente significativas (Gimeno et al.,2006)

Realizaron estudios en la universidad federal de Santa María: trabajaron con 1177 ovocitos obtenidos de la aspiración de folículos de 2 a 8 mm de diámetro de ovarios provenientes del matadero, se dividieron aleatoriamente en cuatro tratamientos con 11 repeticiones. en el grupo control (ovocitos = 296) fueron madurados durante 24 h en TCM-199, más bicarbonato de sodio 25 mM, HEPES 25 mM, FHS, suero de vaca en estro (EVS) y piruvato en una incubadora a 39°C, CO₂ .los grupos sometidos a transporte simulado por 6 (T6, n = 286), 12 (T12, n = 294) o 18h (T18, n = 301) en medio de maduración TCM + HEPES, en baño maría a 39°C, con los mismos componentes utilizados para el Grupo Control, pero con solo 1 mM de bicarbonato de sodio. Después de cada período de transporte, se transfirieron a placas con medio de maduración, completando el período de 24 h en la incubadora, en las mismas condiciones que el Grupo de Control. El período de fertilización fue de 18 h en condiciones similares de temperatura y atmósfera de gas, en FERT-TALP más heparina, con la dosis de inseminación de 1×10^6 espermatozoides / ml, seleccionada por migración ascendente. Los cigotos se cultivaron en medio SOF + 5% EVS durante 8 días, en una incubadora a 39°C con gasificación de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂. En la evaluación de clivaje no hubo diferencia entre



los tratamientos. Las tasas de desarrollo embrionario en el día 7 fueron similares para los grupos Control (20.9%), T6 (19.2%) y T12 (21.4%), con una reducción ($P < 0.05$) observada con el grupo control Y T18 (12,3%). El número de blastocistos eclosionados no fue diferente ($P > 0.05$) entre los grupos Control (136), T6 (125.5) y T12 (126.8). Estos resultados indican la posibilidad de transportar ovocitos bovinos en medio de maduración TCM + HEPES sin control de la atmósfera gaseosa a 39°C durante 12 h (Leivas et al., 2004)



CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno a 3820 m.s.n.m. y geográficamente a una latitud sur de 15° 49' 34.5" y una longitud Oeste de 70° 00'43.5" (SENAMHI, 2005)

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

El material experimental fueron los ovocitos que se aspiraron de los ovarios recolectados del camal de Azoguini Puno, los ovocitos fueron sometidos a los tratamientos en diferentes tiempos de transporte, como se muestra en la siguiente cuadro.

Cuadro 3. Distribución de los ovocitos transportados (HTF) en diferentes tiempos para la producción de embriones *in vitro*.

Tratamientos	4h	8h	12h	Grupo control
N° de ovocitos	250	260	272	250

- T1: transporte de ovocitos en fluido tubal humano (HTF), por 4h.
- T2: Transporte de ovocitos en fluido tubal humano (HTF), por 8 h.
- T3: Transporte de ovocitos en fluido tubal humano (HTF), por12 h.
- Grupo control, maduración de ovocitos en TCM-199, por 24 h con CO₂ al 5%.Sin transporte.

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Preparación de la cámara de incubación portátil de CO_2

- a) Se acondicionó una incubadora portátil (táper de plástico) con una capacidad de 500 mL (Suzuki, et al., 1999). En la tapa del táper se realizó un agujero y se acondicionó una goma, sellada con pegamento especial, en esta tapa de goma se insertó una aguja de 18 G x 1 1/2" unido a una manguera de goma y como seguro se utilizó una pinza
- b) Dentro de la incubadora portátil (taper). Se colocó 0.21 g de gránulos efervescentes de bicarbonato de sodio y sulfato de magnesio desecado (Sal de Andrews®), aseguramos la incubadora portátil y través de la válvula, específicamente por la manguera extraemos 80 mL de aire con una jeringa de 100 mL y por la misma válvula mediante la manguera se adiciono 5 mL de agua destilada sobre los gránulos con la finalidad de que se desprenda CO_2 en aproximadamente el 5%.

3.3.2 Preparación y equilibrio del medio de maduración y cultivo de embriones.

- a) Medio de maduración (TCM): en 1 ml de TCM-199 stock se suplemento 150 uL de (BFS)+ 10 U.I. de eCG + 5 U.I. hCG +10 uL de antimicótico/mL
- b) Medio cultivo denominado (SOFaa): En 1 ml de SOFaa se suplemento 50 ul de (BFS) y 10 ul de antibiótico.
- c) Tanto para medio de maduración y medio de cultivo de embriones se colocó 500 uL del preparado en una placa petry, que se cubrió con aceite mineral y fue colocado dentro de la incubadora portátil (taper),



asegurando la válvula del taper con una pinza hemostática, se introdujo a baño maría convencional.

- d) Los medios de maduración y cultivo se equilibraron a una temperatura de 38.5°C, 5 % CO₂ durante 2 h.

3.3.3 Preparación y equilibrio de medio de transporte

- a) El medio de transporte se preparó con el fluido tubal humano en 1ml (HTF); suplementado con 150 uL de suero fetal+ 10 U.I. de eCG + 5U.I. hCG + 20 uL de AA esenciales +10 uL de AA no esenciales +10 uL de antibióticos/mL.
- b) Se homogenizo el medio de transporte con los suplementos agregados, luego medio el pH, que fue 7,3.
- c) En un vial de 2 ml de tapa rosca, se colocó 500 uL de medio de transporte (HTF) preparado, luego se cubrió con 0.5 mL de aceite mineral y se tapó herméticamente con su respectiva tapa, enseguida el vial fue colocado a baño maría a una temperatura de 38.5 °C durante 2 h para su equilibración.

3.3.4 Obtención de ovocitos

- a) Se recolecto ovarios de vacas sacrificadas en el camal Azoguine, inmediatamente después del sacrificio se extirpo los ovarios y se colocaron en bolsas de polietileno contenidas de NaCl (suero fisiológico 9%) + antibióticos (100 UI/mL de penicilina + 1 mg de estreptomycin), mantenidas dentro de un termo con agua caliente a 30 - 35°C y fueron transportados al laboratorio en un espacio de 2h.



- b) En el laboratorio los ovarios se lavaron dos veces con suero fisiológico a una temperatura de 35°C, posteriormente se colocaron en baño maría a 38°C antes de proceder a la aspiración.
- c) Sujetando el ovario de la parte del hilio con una pinza, el ovario se secó con papel toalla y se procedió a la aspiración.
- d) La aspiración de los ovocitos se realizó por punción de los folículos de 3 a 8 mm con una aguja 18G X 1 1/2" y una jeringa de 5 ml a una presión de 12 ml por minuto.
- e) El contenido aspirado (fluido folicular + ovocitos) se depositó en un tubo de ensayo de 15 mL, que se mantenía dentro de baño maría a 38°C.
- f) Se dejó el tubo en reposo por 10 a 15 min, enseguida se extrajo el sobrenadante del tubo con una jeringa de 10 mL, quedando así un sedimento.
- g) El sedimento (ovocitos + fluido folicular) se vertió a la placa Petri de 35 x 10 mm, para luego realizar la búsqueda y selección mediante el microscopio estereoscopio a un aumento de 25X y 60X.

3.3.5 Simulación de transporte de los ovocitos

3.3.5.1 Selección de ovocitos.

Se utilizaron los ovocitos de categoría A y B, El tipo A corresponde a un ovocito con células del cúmulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente, el tipo B tiene capas múltiples del cúmulus (1 a 3) y un



citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras (Lonergan et al., 1994).

3.3.5.2 Transporte de ovocitos

Posterior a la selección los ovocitos de la categoría A y B se colocaron entre 10 a 15 ovocitos dentro del vial que contenía 500 uL medio de transporte (HTF) equilibrado.

Tapando herméticamente el vial que contiene los ovocitos +HTF, se llevó a baño maría (38.5°) según los tiempos de los tratamientos:(T1=4 h, T2= 8 h y T3=12 h) respectivamente.

3.3.6 Maduración de ovocitos

Después del transporte simulado en fluido tubal humano (HTF), los ovocitos fueron trasladados al medio de maduración (TCM-199); suplementado con 150 uL de suero fetal+ 10 U.I. de eCG + 5U.I. hCG +10 uL de antibióticos/mL. Hasta completar las 24 h de acuerdo a las horas de transporte del ovocito, luego se colocó dentro la incubadora portátil (taper) y esta se colocó en baño maría a una temperatura de 38,5°C con un 5% de CO₂.

3.3.7 Fertilización *in vitro*

Para la fertilización *in vitro* se utilizó el protocolo de (Parrish, et al. 1988).

3.3.7.1 Capacitación de los espermatozoides.

- a) Se extrajo una pajilla de semen congelado del termo criogénico, el cual se descongeló en agua a 37°C por 30 segundos.



- b) Se utilizó un tubo de ensayo, donde se colocó 1 mL de SPERM TALP, el que fue atemperado en baño maria (38.5°), a este tubo se vertió los espermatozoides descongelados, luego el tubo fue cerrado con una tapa de goma, adicionándole 1mL de CO₂ con una jeringa de tuberculina a través de la tapa.
- c) El tubo fue mantenido en baño maría (38.5°C) por un espacio de 25 min, con la finalidad de que los espermatozoides vivos se concentren en la superficie (swim up).
- d) Después del swim up se extrajo 700 uL de la superficie del tubo con ayuda de una jeringa de 1 mL, esta muestra se pasó a otro tubo de ensayo y se centrifugo por 10 minutos a 1600 rpm descartándose el sobrenadante.
- e) La porción rica en espermatozoides (sedimento o pellet) fue re-suspendido con 100 uL de SPERM-TALP + 1ml CO₂ + 2 ul de heparina.



3.3.7.2 Preparaciones de FERT TALP y fertilización de ovocitos:

- a) Dentro de la incubadora portátil se colocó una placa Petri, con 500 uL de medio de fertilización FERT-TALP cubierto con aceite mineral durante 2 h a una temperatura de 38,5°C con un 5% de CO₂.
- b) Posterior a las 2 h de equilibrio de medio de fertilización se sacó la placa petri del taper que contiene el medio sobre la platina que estaba a una temperatura de 38.5 °C .
- c) Al medio de fertilización se le agregó 20 uL de la combinación de penicilamina, epinefrina e hipotaurina (PHE).
- d) Luego se lavó los ovocitos maduros tres veces en FERT TALP y se traspasó los ovocitos al medio de fertilización con la ayuda de una micropipeta.
- e) Luego se adicionó 0.6 uL de espermatozoides a la placa Petri que contiene ovocitos maduros, esta placa Petri que contiene ovocitos maduros + espermatozoides se colocaron nuevamente dentro del taper y está a la vez dentro de baño maría a una temperatura de 38.5°C por espacio de 18 h para su fertilización.
- f) Después de 18 h se vortizó los ovocitos con la finalidad de desnudar los cúmulos de los ovocitos fertilizados



3.3.8 Cultivo de los embriones y evaluación

- a) Después de la fertilización *in vitro* los cigotos fueron cultivados, para que continúen su desarrollo embrionario.
- b) Se cultivaron en placas petri colocando 500 uL del medio cultivo denominado fluido oviductal sintético (SOFaa), las placas petri se colocaron dentro la incubadora portátil a 38.5°C, 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 48 h.
- c) A los 3 y 7 días del cultivo post fertilización los embriones se evaluaron con la ayuda de un microscopio estereoscopio a 25X y 60X, registrando los embriones de acuerdo a estado de desarrollo y calidad (Mórula, blastocito, blastocisto expandido).

3.3.9 Grupo control

Se tomó como grupo control el protocolo utilizado de maduración, fertilización y producción de embriones *in vitro*, aplicado en el Laboratorio de Reproducción Animal tal como se detalla a continuación:

Los ovocitos una vez aspirados y seleccionados son directamente madurados en medio TCM- 199 en placas petry por 24 h, en baño maría a una temperatura de 38,5°C con un 5% de CO₂.

La metodología y los medios que se utilizaron para la fertilización y cultivo de embriones son iguales a los procedimientos antes detallados.



3.4 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de fertilización y producción *in vitro* de embriones, se analizaron mediante la prueba de homogeneidad de proporciones por chi-cuadrado, en tablas de contingencia de 3x2.

$$x^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k \frac{(\theta_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$$

Dónde:

X_c^2 = chi – Cuadrado calculado.

O_i = Frecuencia observada

E_i = Frecuencia esperada

k = Número de columnas (Tratamientos)

r = Número de filas (Fertilización y producción de embriones)



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DE FERTILIZACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS TRANSPORTADOS POR 4, 8 Y 12 HORAS EN MEDIO HTF.

La evaluación de fertilización se realizó al tercer día post fertilización, contabilizándose los embriones que presentaron división celular, donde el tratamiento de 4h de transporte obtuvo un **35.96%** fertilización (37 ovocitos con 2 células , 34 ovocitos con 4 a 8 células y 2 ovocitos de 16 células), tratamiento de 8h de transporte con **26.64%** fertilización (32 ovocitos con 2 células, 26 ovocitos con 4 a 8 células y 3 ovocitos con 16 células) y el tratamiento de 12h de transporte con **16.75%** (22 ovocitos con 2 células y 9 ovocitos con 4 a 8 células), Obteniendo en general una tasa de 26.74% (165/617) de ovocitos fertilizados.

Además se aprecia que de los 782 ovocitos madurados solo 617 (78.9%) ovocitos fueron recuperados post vorterización, perdiéndose 165 (21.9%) ovocitos, esta disminución de ovocitos madurados a ovocitos vorterizados se debe a que en el manipuleo durante el pasaje de los viales de transporte y posterior vorterización, hay una gran dificultad, que permite la pérdida de ovocitos en las paredes de los tubos de ensayo y viales.

Tabla 1. Porcentaje de fertilización de ovocitos transportados por 4, 8 y 12 h al tercer día post fertilización.

Transporte (horas)	Ovocitos madurados	Ovocitos vorterizados	Tasa de Fertilización (%)
T1 4h	250	203	73 (35.96)
T2 8h	260	229	61 (26.64)
T3 12h	272	185	31 (16.75)
TOTAL	782	617	165
%	100	78.9	26.74
Control	250	234	103(44.02)

(p<0.05)

En la tabla 1. Se muestra los resultados de fertilización en diferentes tiempos de transporte, donde el resultado más bajo fue del tratamiento de 12 h de transporte (16.75%), seguido del tratamiento de 8 h de transporte (26.64%), el tratamiento de 4 h (35.96%) y el grupo control fue ampliamente superior (44.02%) a los tratamientos experimentales. Los valores de fertilización según tratamientos, sometidos a la prueba estadística no paramétrica de homogeneidad por chi-cuadrado indica que hay una diferencia en las proporciones entre tratamientos ($p<0.05$).

Leivas et al., (2004), realizaron un trabajo de investigación con la finalidad de evaluar el efecto del medio de transporte sin control de la atmosfera gaseosa, muy similar al presente trabajo, donde utilizaron como medio de transporte TCM+HEPES (1 mM de bicarbonato), obtuvieron una tasa de 84.1% para el tratamiento control, 81.5% tratamiento con 6h de transporte, 85.4% tratamiento 12 h de transporte y 76.1% para el tratamiento 18 h de transporte, estos resultados son superiores al presente trabajo, probablemente por las condiciones ambientales y de equipos a nivel de laboratorio; sin embargo los autores concluyen que cuanto más corto sea el tiempo de transporte, la sincronización entre la maduración nuclear y citoplasmática será mejor (Lehmkuhl, 2001)



por lo tanto las tasas de fertilización serán mejores, resultados que también se muestran en el presente trabajo.

Por otro lado Silva et al. (2011), realizaron un trabajo de transporte de ovocitos bovinos en un medio químicamente definido, además analizaron si es necesaria la adición de hormonas al medio de transporte, como medio de transporte utilizaron TCM-HEPES, en criotubos de 1.5 mL; sus resultados para los tratamientos control 59.7%, 3 h 53.5%, 6 h 46.1%, transporte 9 h 48.8%, transporte 12 h 43.8%; por otro lado Konrad et al., (2013) realizo un trabajo similar donde utilizaron como medio de transporte TCM-199+ HEPES durante 18 h usando tres tratamientos y obtuvieron un 78% (35/45) de división al primer tratamiento (vaca control), 70% (35/50) de clivaje segundo tratamiento (vaca transporte 18 horas) y 34% (10/29) tercer tratamiento de clivaje (búfala transporte 18 horas), los resultados de ambas investigaciones son superiores comparados a los obtenidos en el presente trabajo, debido probablemente que se utilizó un equipo propio para el transporte de ovocitos (Minitube, Alemania), que permite el control exacto de la temperatura y posicionamiento de ovocitos.

Ambrogi et al., (2017), ejecutaron un trabajo de investigación donde evaluaron el comportamiento de ovocitos bovinos transportados en medio suplementado con macromoléculas y antioxidantes; como macromoléculas usaron albumina de suero bovino (BSA) y suero fetal bovino (SFB), y como antioxidantes usaron cisteína, cisteamina y catalasa, los ovocitos se transportaron durante 6 h en una incubadora portátil; los resultados que obtuvieron en fertilización fueron 83.4% control, 79.2% transporte sin antioxidante y 79.6% para transporte con antioxidante. Resultados superiores en comparación al presente trabajo, esta superioridad probablemente se deba a que, transportaron en una incubadora portatil gasificado usando una mezcla gaseosa de 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ y la suplementación de antioxidantes. Se cree que el estrés



por la acumulación de ROS y manipuleo interfieren primeramente en la maduración y posteriormente en la división celular (Ali, Bilodeau y Sirad, 2003).

Según los resultados de la tabla 1, se observa una condición en la cual las tasas de fertilización disminuyen a medida que el tiempo de transporte se incrementa, la explicación del porqué ocurre esta variación, se debería a que el pH del medio de transporte es inestable y las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentan (Silva et al., 2011), debido a que los ovocitos transportados sufren daños exógenos por la tensión supra fisiológica de oxígeno ambiental y luz visible, lo que provoca que el ROS exceda las capacidades de defensa antioxidante de la propia célula, por lo tanto ocurrirán lesiones como la peroxidación lipídica, daño mitocondrial, oxidación de aminoácidos, ácidos nucleicos y finalmente la apoptosis (Kitagawa et al., 2004), el daño a nivel mitocondrial interfiere en la generación de adenosina trifosfato (ATP), molécula fundamental para su uso en los procesos de maduración ovocitaria, fertilización, y desarrollo embrionario posterior (Dadarwal et al., 2015).

4.2 PRODUCCIÓN DE EMBRIONES PROVENIENTES DE TRANSPORTE EN MEDIO HTF POR 4, 8 Y 12 HORAS

La producción embriones se evaluó al día 7 de cultivo, los porcentajes de embriones viables en estadio de mórula y blastocistos se sacaron en relación al número de ovocitos vorterizados. Donde el tratamiento de 4h de trasporte obtuvo **21.18%** de embriones (11 mórulas, 5 mórulas compactas, 24 blastocisto y 3 blastocisto expandidos), tratamiento de 8 h de transporte con **12.6 %** embriones (10 de mórulas, 1 mórula compacta, 18 blastocistos y 0 blastocisto expandido), tratamiento de 12 h con **15.6%**(8 mórulas, 3 mórulas compactas, 17 blastocistos y 1 blastocisto expandido).

Tabla 2. Porcentaje de producción de embriones provenientes de ovocitos transportados por 4, 8 y 12 h en medio HTF.

Transporte (horas)	Ovocitos vorterizados	Producción de embriones		
		Mórulas (%)	Blastocistos (%)	Total (%)
T1 4	203	16 (7.88)	27 (13.30)	43 (21.18)
T2 8	229	11 (4.80)	18 (7.86)	29 (12.66)
T3 12	185	11 (5.95)	18 (9.73)	29 (15.68)
Control	234	18 (7.69)	48 (20.51)	66(28.11)

(p<0.05)

En la tabla 2 se muestra los resultados de producción de embriones *in vitro* en diferentes tiempos de trasporte, donde se observa para 4h (21.18%), 8h (12 .66%) y, 12h (15.68 %) y grupo control (28,11%); estos resultados sometidos a la prueba estadística no paramétrica de chi-cuadrada indica que hay una diferencia en las proporciones de producción de embriones entre tratamientos (p<0.05).



La investigación realizada por Leivas et al., (2004) muy similar al presente trabajo, en medio transporte TCM+HEPES sin control de gases, obtuvo al día 7 de cultivo una tasa de blastocistos de 19.2% para 6 h de transporte, 12 h de transporte 21.4% ,18 h de transporte 12.3% y 20.9 % tratamiento control, resultados superiores al presente trabajo, los autores indican que la acción de los amortiguadores o tampones buffer como el HEPES, en medios TCM-HEPES (Schwartz et al., 1998) TALP-HEPES (Scherthamer et al.,1998), y utilizados como medio de transporte influyen en el desarrollo embrionario posterior, afectando la producción de embriones post fertilización in vitro, ya que no mantienen las condiciones por largos periodos, lo que hace necesaria la gasificación.

Silva et al. (2011), utilizaron como medio de transporte TCM-HEPES, donde obtuvieron una tasa de blastocistos al 7 día: 32,3 % en 3 h de transporte, 27.3% en 6h de transporte, 24.8% en 9h, 18.9% en 12h. En tanto Konrad et al. (2013), quienes utilizaron TCM-199 como medio de transporte a 18 h obtuvieron 27.0% de blastocitos, esta superioridad se deba tal vez a las condiciones de transporte de Minitube (incubadora portátil) que tiene adentro ,las esferas metálicas que permite el posicionamiento de los ovocitos transportados.

Ambrogi et al., (2017), obtuvieron al día 7 de cultivo una tasa de blastocistos de 33.2% para el grupo control (FCS+antiox), 34.5% para 6 h con medio transporte TCM+ antioxidantes. Resultados superiores en comparación al presente trabajo, esta superioridad probablemente se deba a que, transportaron en una incubadora portátil gasificado usando una mezcla gaseosa de 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ y la suplementación de antioxidantes. Se cree que el estrés por la acumulación de ROS y manipuleo interfieren primeramente en la maduración y posteriormente en la división celular (Ali, Bilodeau y Sirad, 2003).



Por otro lado los valores inferiores obtenidos en el presente trabajo se deberían a la limitación de algunos insumos necesarios para la producción de embriones, como también al equipamiento de laboratorio; demostrándose que las condiciones de transporte, insumos utilizados y equipamiento adecuado, afectan la competencia de desarrollo y por ende disminuyen la viabilidad de los embriones (Silva et al., 2011)

Las tasas de blastocistos son similares a los encontrados por Oliver et al., (1998), quienes transportaron ovocitos en tubos de poliestireno colocados en bolsas plástico gasificadas, donde obtuvieron tasas de 23.1 % y 30.9% para el sistema de baño maría y control, otro trabajo similar es el de Suzuky et al. (1998), quienes utilizaron una incubadora portátil de CO₂, obteniendo una tasa de 15.3 % de blastocistos, demostrando al igual que en el presente trabajo, que puede usarse de manera eficiente este tipo de sistemas, que resultan más prácticos y menos costoso para su uso a nivel de campo.



V. CONCLUSIONES

- La mejor tasa de fertilización para los ovocitos transportados en diferentes tiempos, fue a 4 h transporte, seguida a 8 y 12 horas respectivamente.
- El transporte de ovocitos bovinos en medio HTF en diferentes tiempos es posible, sin embargo la producción de embriones disminuye considerablemente cuando el tiempo transporte se extiende.



VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que el tiempo de transporte de ovocitos en medio HTF debe ser el más corto posible, para evitar daños oxidativos y de estrés.
- Se recomienda probar otros medios de transporte y suplementarlos con otros insumos para tener buenos resultados



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

- Adams, G., R. Jaiswal., J. Singh and P. Malhi. 2008. "Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle." Science direct; Theriogenology 69; pag 72–80.
- Ahuja, C., F. Montiel, P. Pérez y J. Gallegos. 2009. Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. Rev. Zootecnia Tropical (revista en internet) (consultado 14 de agosto de 2013); 27 (03).
- Ali, A., A. Bilodeau and M. A. Sirard. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. Theriogenology, 59, 939–949.
- Aller, J., R. Alberio y G. Palma. 2015. Gestación con embriones producidos in vitro a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. Revistas electrónicas UACH. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
- Ambrogi, M., P. Dall'Acqua, N. Rocha-Frigoni, B. Leao, G. Mingoti. 2017. Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development in vitro. Reprod Dom Anim. DOI: 10.1111/rda.12923.
- Arav, A. 2001. "Trans illumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. a new technique report." Elsevier Science Inc.;Theriogenology 55; pag 1561-1565.
- Arlotto, T., J.L. Schwartz., N.L. First and M.L. Leibfried. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. Theriogenology 45:943-956.



- Avery, B. and T. Greve. 1995. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*. Vol. 44, pp.871-878.
- Boiso, I., A. Veiga y R. Edwards. 2003. Fundamentos del crecimiento embrionario humano in vitro y de la selección de embriones de alta calidad para transferencia. *Reproducción asistida moderna*, (ares trading Uruguay S.A) Montevideo; Uruguay, 65-440.
- Conti, M., M. Hsieh, J.Y. Park and Y. Su. 2006. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol*, 20, 715-723.
- Crespo, J. y E. Huaman . 2015. Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion. carrera de ingeniería agronómica Escuela Agrícola Panamericana; Zamorano,Honduras.
- Crocomo, L. F., W. C. Marques., F. C. Landim and S. D. Bicudo. 2012. "Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos." *Rev. Bras. <Reprod. Anim., Belo Horizonte*, v.36, n.1, pag 25-31.
- Dadarwal, D., G. P. Adams, P. Hyttel, G. M. Brogliatti, S. Caldwell & Jaswant Singh.2015. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. *Reproductive Biology and Endocrinology* volume 13, Article number: 124
- Dieleman ,S., P.J. MHendriksen, D. Viuff, P.D. Thomsen, P. Hyttel, H. M. Knijn, C. Wrenzycki, T. A. MKruip, H. Niemann, B.M. Gadella, M. M. Bevers and P.L. Vos. 2002. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* Volume 57, Issue 1, Pages 5-20



- Fernández, A., T. Díaz y G. Muñoz. 2007. Producción in vitro de embriones Bovinos. Reproducción animal. Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 48(1): 51-60. 2007.
- Franchi, L., A. Mandl and S. Zuckerman. 1962. The development of the ovary and the process of oogenesis. En: the ovary, editado por S. Zuckerman, p 1-88.
- Fry, R., E. Niall, T. Simpson, T. Squires and J. Reynolds. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology. 47: 977-987.
- Galina, C. y J. Valencia. 2008. Reproducción de los animales domésticos. Tercera edición. Editorial Limusa Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma México.
- García, J. y J. Martínez. 2013. Implementación de un protocolo de Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano carrera de ingeniería agronómica Escuela Agrícola Panamericana; Zamorano, Honduras
- Gilbert, A. 2005. Biología del desarrollo. Editorial Médica Panamericana. 7° edición Buenos Aires, Argentina 670-673.
- Gimeno, L., M.A. López, M. Meseguer, J.M. de los Santos, A. Pellicer y J. Remohí. 2006. Estudio comparativo de dos medios de cultivo HTF e ISM-1: implicaciones en el fenotipo embrionario y resultados clínicos. revista iberoamericana de fertilidad. vol 23. p377-378.
- Gordon, I. 1996. Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos; Editorial Acribia S.A., Zaragoza – España.
- Gordon, I. 2003. Citado por: Céspedes “Efecto del Fluido Folicular y Fluido Ovidutal en la Maduración y Fertilización In vitro de Ovinos de Vacuno”. Universidad Nacional del Altiplano. Tesis 2013. Puno - Perú. pp.1.



- Guevara,S. 2017. Influencia de un sistema de cocultivo con células del cúmulus oophorus en la calidad de embriones producidos in vitro(brachiller). facultad de ingeniería zootecnista, agronegocios y biotecnología escuela profesional de ingeniería zootecnist,chachapoyas –peru
- Hafez, E. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 78ed. España. Edit. MC Graw Hill.
- .Herradon, P.G., L.A. Quintela, J.J. Becerra, S. Ruibal y M. Fernández. 2007. Fecundación in vitro. Alternativa para la mejora genética en bovinos. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 15(1): 34-41.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2013. Resultados definitivos del IV censo nacional Agropecuario. Lima- julio.
- Kitagawa, Y., K.Suzukib, A. Yonedaa, T. Watanabea. 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA frag-mentation on porcine embryos. Theriogenology, 62, 1186–1283.
- Konrad,J.L.,R.Scian,M.J.Garrido,G.Taminelli,M.Sansinena.2013. Producion de embriones de búfalos por fertilización in vitro luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado.facultad de ciencias veterinarias universidad nacional del Nordeste sargento Cabral- lab .reprod. Anim-Argentina.
- Leibfried, L. and L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. J. Anim. Se. 48:76-83



- Lehmkuhl, R.C. 2001. Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução) - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. 21f
- Leivas, F.G., D. Brumn, A. Mezzalira, L. Caceres, M. Bernardi, M. Batistella and C. Mondino. 2004. Transport of bovine oocytes in maturation medium without a controlled gaseous atmosphere. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.1, p.219-224, jan-fev,
- Liu, S., Y. Li, H.L. Feng, J.H. Yan and Z.J. Chen, 2010. Dynamic modulation of cytoskeleton during in vitro maturation in human oocytes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 203, 151-157.
- Liu, Z. and R.H. Foote. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biology of Reproduction* 53:786-790.
- Lonergan, P., P. Monaghan, D. Rizos, M. P. Boland and I. Gordon. 1994. Effect of Follicle Size on Bovine Oocyte Quality and Developmental
- Lonergan , A., F.B .Ward,. P. Enright & M. P. Boland. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo pro-duction in vitro using ovum pickup technology. *Theriogenology*, 54, 433-446. Competence Following Maturation, Fertilization, and Culture In Vitro." *Molecular Reproduction and development*; 37 pag 48-53.
- Martínez, B. 2002. Estudio de la fecundación "in vitro" en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción in vitro de embriones. tesis para optar por el grado de doctor.



- Mucci, N., J.F. Aller, G.G. Kaiser, F. Hozbor y R.H. Alberio. 2006. Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch. Med. Vet., 38(2): 97-104.
- Olivier, N.S, G.A Palma, R. alberto. 1998. In vitro production of bovine embryos in water bath. Theriogenology, v.49, p.211,
- Palma, G. 2001. Biotecnología de la Reproducción; Editor Instituto Nacional de tecnología Agropecuaria; ISBN 987-43-3779-6.
- Parrish, J.J., J. Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. 38: 1171-1180, phone: 608-265-4169, babcock@calshp.cals. wisc.edu.
- Quinn, P., J.F. Kerin and G.M. Warnes. 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril; 44: 493-498.
- Reyes, M., D. Luna and J. Palomino. 2010. Meiotic development and cortical granules distribution in canine oocytes during in vitro maturation. Reprod. Fertil. Dev. 22, 324-325. Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Madison, WI 53706 USA,
- Richard, F. J. 2007. Regulation of meiotic maturation. J. Anim. Sci, 85, 4-6.
- Rizopatron J., R. Sánchez, N. Sepúlveda, P. Peña, E. Villagran and W. Miska. 1996. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: Comparison with washing/centrifugation Theriogenology Volume 46, Issue 1, Pages 65-73
- Ruane, J. and M. Zimmermann. 2003. Estudio FAO Investigación y Tecnología. Biotecnología agrícola para países en desarrollo. Impreso. 124p. vol. 8. Roma. IT.



- Salisbury, G.W., N.L. VanDemark y J.R. Lodge. 1978. Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los Bóvidos. Segunda Edición. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España.
- Sasamoto, Y., M. Sakaguchi., S. Katajiri, Y. Yamada and Y. Takahashi. 2003. The effects of twisting and type of aspiration needle on the efficiency of transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle. Journal Veterinary Medicine Science; Theriogenology 65; pag 1083-1086.
- Seidel, G. y S. Meare. 2013. Evaluación de dos protocolos para la producción in vitro de embriones "bovinos" Bos taurus en la región de Ayacucho, 2012-2013. Escuela profesional de Biología Universidad nacional de San Cristobal de Huamanga Ayacucho –Peru
- SENAMHI. 2005. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología
- Sepulveda, S. 2008. Fecundación y desarrollo en mamíferos, Fertilidad y reproducción asistida Editorial medica panamericana (1 ° ed.) Venezuela
- Shemesh, M., M. Gurevich, E. Harel-Markowitz, L. Benvenisti, S.L. Shore and Y. Stram. 2000. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. MolReprodDev56:306–308
- Scherthaner, W., H. Wenigerkind ,M. Stojkovic ,G. Palma ,J. Mödl ,E. Wolf , 1070 G.Brem . 1998. Storage of bovine oocytes after ultrasound guided follicle aspiration: Effects on developmental competence. In: REUNION A.E.T.E., 1072 14e., Venise. Proceedings... Venise : A.E.T.E., 1998. p.242. 1073



- Schwartz, J., M. Schneider, J. Rodrigues, H. Reichenbach. 1998. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent in vitro embryo development. *Theriogenology*, v.49, n.1, 1076 p.217.
- Silva, L., A. Reis, A.O. Silva, A. Sousa y W. Vale. 2011. Transporte de oóцитos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.1, p.74-80
- Suzuki, T., C. Sumantri, N. Khan, M. Murakami, S. Saha. 1999. Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for in vitro production of bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 53; 149-157.
- Suzuki, T., C. Sumantri, N. Khan, 1998. Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for production of bovine IFV embryos. *Theriogenology*, v.43, p.330
- Vanhoutte, L., D. Nogueira and P. De Sutter. 2009. Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental. *Human reproduction*, 24(3), 658-669.
- Ward, F., A. P. Lonergan, B. P. Enright & M. P. Boland. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pickup technology. *Theriogenology*, 54, 433-446.



ANEXOS



ANEXO 1

FICHAS DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO SEGÚN TIEMPO DE TRANSPORTE

Cuadro 4. Desarrollo embrionario en 4 horas de transporte en medio HTF

Repetición	N° de Ovocito viables	Ovocitos vorterizados	3día de fertilización	7 día de Cultivo
1	19	19	36.84%(7)	26%(5)
2	16	16	37.50%(6)	31%(5)
3	57	40	27.50%(11)	10%(4)
4	37	21	38.09%(8)	19%(4)
5	14	13	23.07%(3)	15%(2)
6	29	17	23.53%(4)	24%(4)
7	12	12	58.33%(7)	33%(4)
8	23	10	50.00%(5)	20%(2)
9	21	17	70.59%(12)	35%(6)
10	55	38	26.32%(10)	18%(7)
Total	250	203	35.96%(73)	21%(43)

Cuadro 5. Porcentaje de fertilización al 3 y 7 día en 8h de transporte

Repetición	N° de ovocitos Viables	N° de ovocitos madurados	3día post de fertilización	7 día de cultivo
1	35	28	54%(15)	7.14%(2)
2	20	15	53%(8)	26.67%(4)
4	56	53	15%(8)	15.09%(8)
5	53	48	21%(10)	16.67%(8)
6	55	51	29%(15)	7.84%(4)
7	41	34	15%(5)	8.82%(3)
Total	260	229	26.64%(61)	12,66%(29)

Cuadro 6. Porcentaje de fertilización al 3 y 7 día en 12 h de transporte

Repetición	N° de ovocitos viables	N° de ovocitos vorterizados	3 día post fertilización (clivaje)	7 día de cultivo
1	51	46	11%(5)	10.87%(5)
2	45	15	27%(4)	20.00%(3)
2	47	32	19%(6)	12.50%(4)
3	42	33	9%(3)	9.12%(3)
4	30	25	20.00%(5)	20.00%(5)
5	52	34	24%(8)	26.47%(9)
Total	267	185	16.75%(31)	15.67%(29)

Cuadro 7. Producción in vitro de embriones a los 3 días de fertilización

T	N° de Madurados	División de embriones a los 3 días de fertilización						N° total de embriones	%
		2 células	%	8 células	%	16 células	%		
4h	203	37	18.22	34	16.75	2	0.98	73	35.96
8h	229	32	13.97	26	11.35	3	1.31	61	26.64
12h	185	22	11.89	9	4.86	0	0	31	16.75



Cuadro 8. Producción in vitro de embriones a los 7 días de fertilización

T	N° ovocitos maduros	División de embriones a los 7 días de fertilización								N° total de embriones	%
		N° de Mórulas	%	N° de Mórulas compactas	%	N° de blastocistos	%	N° de blastocisto expandidos	%		
4h	203	11	5.4	5	2.46	24	11.82	3	1.48	43	21.18
8h	229	10	4.3	1	0.44	18	7.86	0	0.00	29	12.66
2h	185	8	4.3	3	1.62	17	9.19	1	0.54	29	15.67

ANEXO 2

CUADROS DE RESULTADOS PARA REALIZAR LAS PRUEBAS DE CHI-

CUADRADO

Cuadro 9. Resumen del procesamiento de los casos para fertilización

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Fertilización * Tiempo de transporte	851	100,0%	0	0,0%	851	100,0%

Cuadro 10. Cuadro de contingencia de Fertilización * Tiempo de transporte

		Tiempo de transporte				Total
		4 Horas	8 Horas	12 horas	Control	
Fertilización	Recuento	73	61	31	103	268
	Frecuencia esperada	63,9	72,1	58,3	73,7	268,0
	% dentro de Fertilización	27,2%	22,8%	11,6%	38,4%	100,0%
	% dentro de Tiempo de transporte	36,0%	26,6%	16,8%	44,0%	31,5%
	% del total	8,6%	7,2%	3,6%	12,1%	31,5%
	Recuento	130	168	154	131	583
	Frecuencia esperada	139,1	156,9	126,7	160,3	583,0
	% dentro de Fertilización	22,3%	28,8%	26,4%	22,5%	100,0%
	% dentro de Tiempo de transporte	64,0%	73,4%	83,2%	56,0%	68,5%
	% del total	15,3%	19,7%	18,1%	15,4%	68,5%
	Recuento	203	229	185	234	851
	Frecuencia esperada	203,0	229,0	185,0	234,0	851,0
% dentro de Fertilización	23,9%	26,9%	21,7%	27,5%	100,0%	
% dentro de Tiempo de transporte	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
% del total	23,9%	26,9%	21,7%	27,5%	100,0%	

Cuadro 11. Pruebas de chi-cuadrado para fertilización según tiempos de transporte

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	40,014 ^a	3	,000
Razón de verosimilitudes	41,379	3	,000
Asociación lineal por lineal	2,117	1	,146
N de casos válidos	851		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 58.26.

Interpretación: ($p < 0.05$) Existe diferencia en las proporciones de fertilización in vitro entre los tiempos de transporte.

PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA DESARROLLO EMBRIONARIO SEGÚN TIEMPOS DE TRANSPORTE**Cuadro 12. Resumen del procesamiento de los casos para desarrollo embrionario**

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Desarrollo embrionario * Tiempo de transporte	851	100,0%	0	0,0%	851	100,0%

Cuadro 13. Cuadro de contingencia Desarrollo embrionario * Tiempo de transporte

		Tiempo de transporte				Total	
		4 Horas	8 Horas	12 horas	Control		
Desarrollo embrionario	Recuento	43	29	29	66	167	
	Frecuencia esperada	39,8	44,9	36,3	45,9	167,0	
	Embrión desarrollado	% dentro de Desarrollo embrionario	25,7%	17,4%	17,4%	39,5%	100,0%
	% dentro de Tiempo de transporte	21,2%	12,7%	15,7%	28,2%	19,6%	
	% del total	5,1%	3,4%	3,4%	7,8%	19,6%	
	Recuento	160	200	156	168	684	
	Frecuencia esperada	163,2	184,1	148,7	188,1	684,0	
	No desarrollado	% dentro de Desarrollo embrionario	23,4%	29,2%	22,8%	24,6%	100,0%
	% dentro de Tiempo de transporte	78,8%	87,3%	84,3%	71,8%	80,4%	
	% del total	18,8%	23,5%	18,3%	19,7%	80,4%	
	Recuento	203	229	185	234	851	
	Frecuencia esperada	203,0	229,0	185,0	234,0	851,0	
Total	% dentro de Desarrollo embrionario	23,9%	26,9%	21,7%	27,5%	100,0%	
	% dentro de Tiempo de transporte	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% del total	23,9%	26,9%	21,7%	27,5%	100,0%	



Cuadro 14. Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	20,099 ^a	3	,000
Razón de verosimilitudes	20,002	3	,000
Asociación lineal por lineal	5,141	1	,023
N de casos válidos	851		

a. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 36.30.

Interpretación ($p < 0.05$): Existe diferencia en las proporciones de producción de embriones según tiempos de transporte.

ANEXO 3**COMPOSICION DE MEDIOS Y PREPARACION****MEDIO DE TRANSPORTE HTF (FLUIDO TUBAL HUMANO)**

Componentes	mM
Sodium Chloride	97.8
Potassium Chloride	4.69
Magnesium Sulfate, Anhydrous	0.20
Potassium Phosphate, Monobasic	0.37
Calcium Chloride, Anhydrous	2.04
Sodium Bicarbonate	25.0
Glucose	2.7
Sodium Pyruvate	0.33
Sodium Lactate	21.4
Gentamicin	10 µg/mL
Phenol Red	5 mg/L

MEDIO DE MADURACIÓ (TCM-199 – Medio de maduración)

Para el medio de maduración se preparó el medio TCM-199 0.25-mM Hepes (STOCK), la cual se mantuvo en congelación en crioviales de 1mL a -40 °C.

Componentes de medio TCM 199 – Medio de maduración.

Componentes	g/10 mL
TCM-199 (c/sales de Earl, 0.25 Mm Hepes)	0.151 g
Piruvato de sodio	0.022 g
NaHCO ₃	0.022 g
Gentamicina	50 ug/mL
eCG	20 U.I/mL
hCG	100 U.I/mL

➤ Se filtró en micro poro de 0.22 µ y se ajustó el pH de 7.2 a 7.4.



MEDIO PARA FERTILIZACIÓN IN VITRO

El medio FERT TALP (Parrish et al, 1988) es el medio utilizado para el co-cultivo de los ovocitos y espermatozoides, para lo cual se preparó y se conservó a 5°C en viales de 5 mL.

Medio Stock tyrode lactato modificado FERT TALP.

COMPUESTO	Final Mm	50 mL	100mL
NaCl	114	333 mg	666 mg
KCl	3.2	11.75 mg	23.5 mg
NaHCO ₃	25.0	105.2 mg	210.4 mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.4	2.76 mg	5.52 mg
Gentamicina	24mg/mL	16.5 uL	33 uL
Rojo fenol	1%	50 uL	100 uL

➤ Homogenizar suavemente y agregar los siguientes componentes:

CaCl ₂ 2H ₂ O	2.0	15 mg	30 mg
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5	5 mg	10 g

Determinar el pH y ajustar a 7.4 y la osmolaridad a 290-300 mOs

➤ Posteriormente la solución se filtró con un dispositivo de microporo 0.22 um, y se conservó.



FERT-TALP solución de trabajo

- El día de su uso se preparó:

		Cantidad /mL	
Sperm-Talp (stock)	1mL		5 mL
BSA Fracción V		6 mg/mL	30 mg
Piruvato de sodio (stock)		10 uL/mL	50 uL
Gentamicina		25 ug/mL	125 ug

Se Homogenizo y se ajusto el pH a 7.5 con la adición de CO₂.

MEDIO DE PREPARACIÓN Y SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES.

Se utilizó el Medio SPERM TALP (Parrish et al,1988), el cual se conservó a 5°C en viales de 5 mL.

Medio stock tyrode lactato modificado SPERM-TALP.

Compuesto	Final mM	50 mL	/100 mL
NaCl	100	292.0 mg	584 mg
KCl	3.1	11.5 mg	23 mg
NaHCO ₃	25.0	105.0 mg	210 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.3	2.0 mg	4 mg
Hepes	10.0	119.0 mg	238 mg
Gentamicina	25 ug/mL	50 uL	100 uL
Lactato de sodio (60%)	21.6 uL	184 uL	368 uL
Rojo fenol (1%)	1 uL/mL	50 uL	100 uL

Agregar estos dos componentes al final, agitando suavemente la solución

CaCl ₂ .2H ₂ O	2.0	15.5 mg	31 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.4	4.0 mg	8 mg

Se ajustó el pH a 7.4 y por último se filtró con un micro poro 0.22 um

SPERM-TALP solución de trabajo

- El día de su uso se preparo

Cantidad /mL		
Sperm-Talp (stock)	1 mL	5 mL
BSA Fracción V	6 mg/mL	30 mg
Piruvato de sodio (stock)	10 uL/mL	50 uL
Gentamicina	25 ug/mL	125 uL

Se ajustó el pH a 7.4 con la adicción de CO₂.

MEDIOS DE CULTIVO

Lo medio de cultivo se prepararon y conservaron por espacio de 3 meses como máximo.

Medio de cultivo SOFaa según Tervit et al (1972), modificado por Fisher y Brown (2005)

Composición del medio fluido oviductal sintético (SOFaa).

Componentes	mM	g/ 100 mL
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.7	0.0251
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.49	0.0100
NaCl	99.25	0.5800
KCl	7.16	0.0534
NaHCO ₃	26.19	0.2200
KH ₂ PO ₄	1.14	0.0162
Piruvato de sodio	0.33	0.0036
HEPES	19.97	0.4760
Gentamicina		40 uL
Lactato de sodio 60%		47 uL
D- Glucosa	1.5	0.0270
BSA (serumalbuminbovine)	4g/L	0.4000
Glicina	10	0.0750
Alanylglutamina	0.67	0.0146
MEN aminoácidos no esenciales	1%	1 mL
MEN aminoácidos esenciales	2%	2 mL
Rojo Fenol 1%	1%	100 uL
PVA (alcohol polivinilico)	11.62	0.1000
Agua ultra pura		100 mL

Se homogenizo suavemente y se ajustó el pH a 7.4 con NaOH, la osmolaridad debe estar en 280 mOsm

Se filtró en microporo de 0.22 um

Por último se conservó en crioviales de 1 mL de capacidad a -40 °C.

ANEXO 4

FIGURAS DE PROCESAMIENTO



Figura 1. Transporte de ovarios a 35 °C,
en solución salina y antibióticos



Figura 2. Lavado y preparación de ovarios
para la aspiración folicular

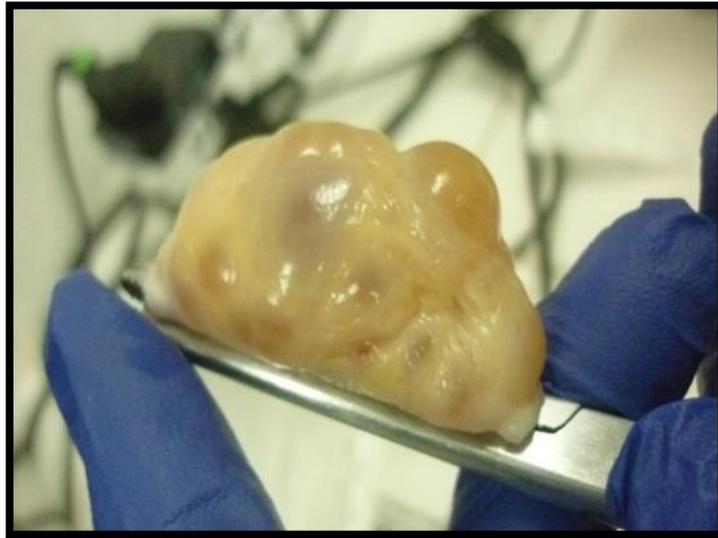


Figura 3. Folículos de mayores de 3mm para aspiración folicular.



Figura 4. Preparación de materiales y medio de transporte



Figura 5. Esterilización y preparación de materiales

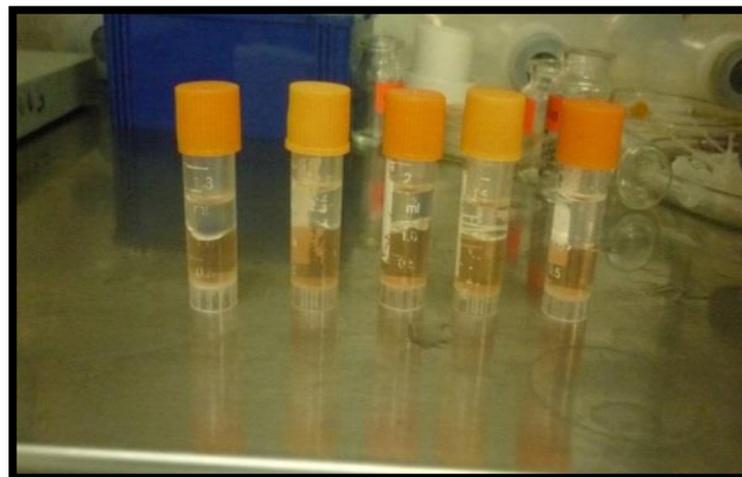


Figura 6. Medio de transporte HTF, en crioviales



Figura 7. Transporte de ovocitos en medio HTF, sumergidos en baño maria

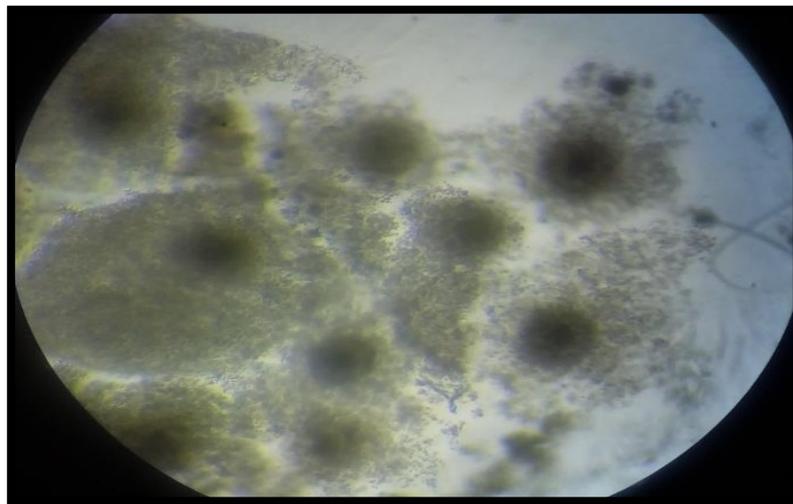


Figura 8. Ovocitos maduros con células de cúmulos oophorus con expansión y elasticidad completando las 24 horas

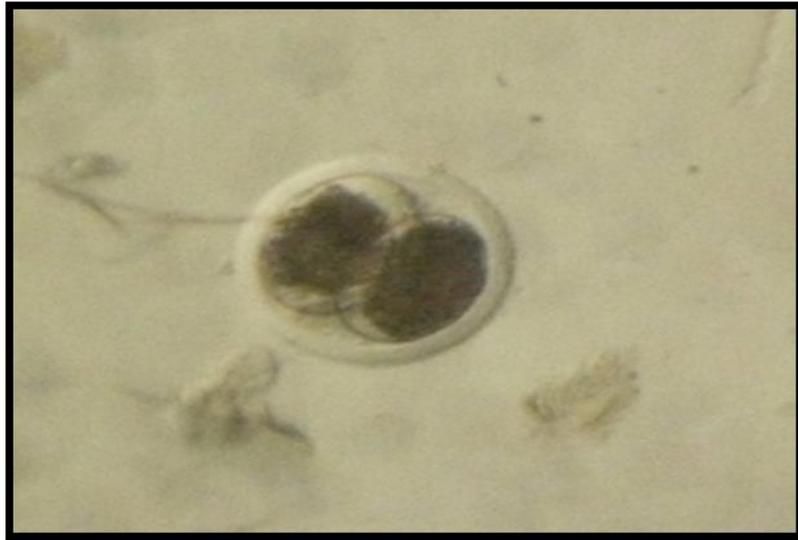


Figura 9. Evaluación de división celular post fertilización (Embrión de 2 células)

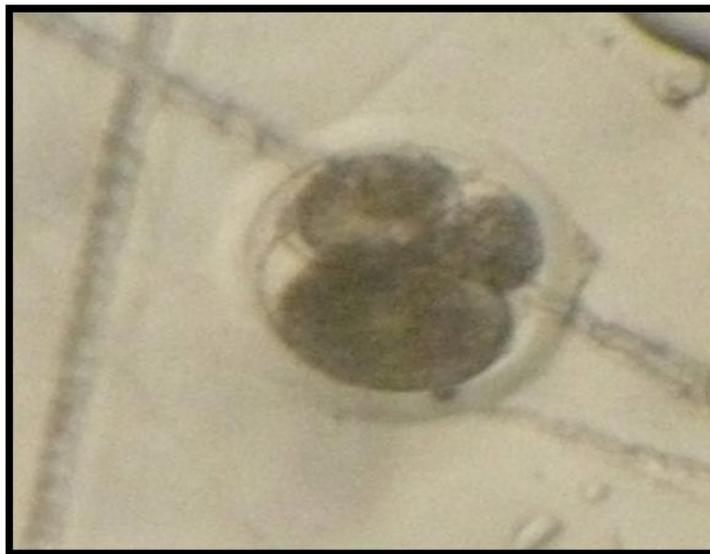


Figura 10. Embrión de 4 células



Figura 11. Embrión de 8 células

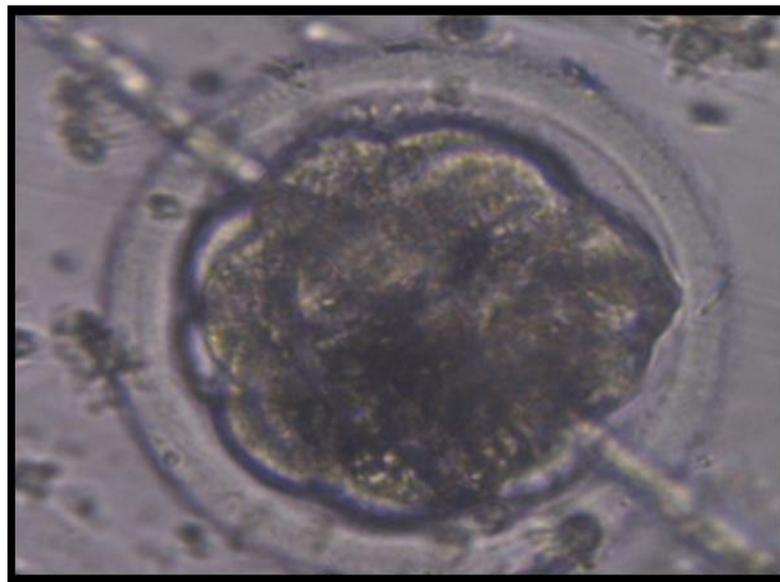


Figura 12. Mórula



Figura 13. Blastocisto



Figura 14. Cámara portátil de producción de embriones FIV