

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE ADICIÓN DE CO₂ A UNA
INCUBADORA PORTÁTIL EN LA PRODUCCIÓN DE
EMBRIONES *In vitro* DE VACUNOS”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. BENICIO TEONILO QUISPE VILLALTA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE ADICIÓN DE CO₂ A UNA
INCUBADORA PORTÁTIL EN LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *In vitro*
DE VACUNOS”

PRESENTADA POR:

Bach. BENICIO TEONILO QUISPE VILLALTA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR:

PRESIDENTE :

M. Sc. BILO WENCESLAO CALSIN CALSIN

PRIMER MIEMBRO :

M.V.Z. CIRIACO TEÓDORO ZUÑIGA ZUÑIGA

SEGUNDO MIEMBRO :

M. Sc. JAPHET D. ZAPANA PINEDA

DIRECTOR / ASESOR :

Dr. Sc. MANUEL GUIDO PEREZ DURAND

Área : Reproducción Animal

Tema : Adicción de CO₂ en producción de embriones en vacunos

Fecha de sustentación: 17-11-17

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme.

A mi familia.

A mi esposa Yolanda Mamani Yucra y a mis hijos Raúl y José.

Benicio Quispe Villalta

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Altiplano Puno.

A los docentes y personal administrativo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Dr. Manuel Guido Pérez Durand, por la dirección del presente trabajo de investigación.

A los miembros del jurado revisor del presente trabajo de investigación Dr. Bilo Calsin Calsin, Dr. Ciriaco Zuñiga Zuñiga y Dr. Jhapet Zapana Pineda por su apoyo en la corrección y presentación final del trabajo de tesis.

BENICIO QUISPE VILLALTA

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1. Producción de embriones <i>in vitro</i>	14
2.1.2. Obtención de los ovocitos.....	14
2.1.3. Selección de ovocitos.....	15
2.1.4. Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos.....	15
2.1.5. Evaluación morfológica de la maduración de ovocitos.....	16
2.1.6. Medios de maduración de ovocitos	18
2.1.7. Suplementos al medio de maduración	18
2.1.8. Fertilización in vivo de ovocitos bovinos	19
2.1.9. Preparación del semen de toro	20
2.1.10. Co-cultivo de los ovocitos con las células espermáticas....	22
2.2.11. Evaluación de la fertilización.....	23
2.2. Antecedentes de trabajos de producción de embriones en la adición del CO ₂ a dispositivos no convencionales	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Lugar de estudio	27
3.2. Material biológico	27
3.4. Equipos y materiales de laboratorio	31
3.5. Metodología.....	32

3.5.1. Transporte de los de ovarios de vacas beneficiadas en el camal.....	32
3.5.2. Obtención de ovocitos	33
3.5.3. Clasificación de ovocitos.....	34
3.5.4. Maduración <i>in vitro</i>	34
3.5.5. Evaluación de la maduración de los ovocitos	36
3.5.6. Fertilización <i>in vitro</i>	37
3.5.7. Evaluación de la fertilización.....	39
3.5.8. Cultivo y evaluación de embriones.....	39
3.6. Método estadístico.	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1. Folículos sobre la superficie del ovario.....	41
4.2. Calidad de los ovocitos recuperados	42
4.3. Maduración y fertilización.....	45
4.4. Producción de embriones.....	49
V. CONCLUSIONES.....	54
VI. RECOMENDACIONES.....	55
VII. REFERENCIAS	56
ANEXOS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Colección de ovarios de vacas en el camal	63
Figura 2: Transporte de ovarios	63
Figura 4: Preparación de medios	63
Figura 3: Aspiración de folículos	63
Figura 5: Incubadora portátil	63
Figura 6: Maduración de ovocitos	63
Figura 8: Ovocitos maduros con corpúsculos	63
Figura 7: Embriones a los 3 días post fertilización.	63
Figura 9: Embriones de 7 días.	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Registro del número de folículos en la superficie de los ovarios y número de ovocitos recuperados por ovario.	27
Tabla 2: Registro de la calidad de ovocitos, por ovario por vaca.	27
Tabla 3: Registro de la maduración y fertilización de los ovocitos	28
Tabla 4: Numero de folículos en la superficie del ovario y ovocitos recuperados	42
Tabla 5: Número de ovocitos y calidad recuperados de los ovarios	43
Tabla 6: Proporción de ovocitos madurados y fertilizados	46
Tabla 7: Producción de embriones a los 7 días post fertilización (%)	50

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona luteinizante
COCs	Complejo cúmulos ovocitos
TCM	Medio de cultivo tisular
mPBS	Medio de solución buffer fosfatada
μL	Microlitro
mL	Mililitro
ug	Microgramo
g	Gramo
g.	Gravedades
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmoles
UI	Unidad internacional
mm	Milímetro
cm	Centímetro
PHE	Penicilamina, hipotaurina y epinefrina
RPM	Revoluciones por minuto
HEPES	Solución tampón
eCG	Gonadotropina corionica equina
hCG	Gonadotropina corionica humana
BSA	Sero albumina bovina
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Grados centígrados
FIV	Fertilización in vitro
MIV	Maduración in vitro
SFB	Suero fetal bovino

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno. Ubicado a una altitud de 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" en la meseta del Collao. El objetivo principal fue Determinar el porcentaje de producción de embriones *in vitro* a partir de los ovocitos aspirados de los ovarios de vacas sacrificadas en el camal, dentro una incubadora portátil. Para la maduración, fertilización y producción de embriones a partir de los ovocitos aspirados de los ovarios, se utilizó una incubadora portátil que se adecuo un taper de plástico que tenía las siguientes medidas largo= 16 cm, ancho= 11 cm, alto= 5.8 cm con un volumen total de 500 mL, al taper se le acondiciono en la tapa una válvula de conexión con una aguja 18G 1¹/₂ unido a una manguera de silicona con un diámetro de 5 mm y como seguro se utilizó una pinza hemostática para evitar la salida del CO₂ de su interior. El CO₂ se adiciono a la incubadora portátil de la siguientes formas: Tratamiento 1: Previamente se extrajo 50 mL de aire con ayuda de una jeringa de plástico, el 5% de CO₂ se adiciono por desprendimiento de 0.21 g de gránulos efervescentes que estaban en el interior de la incubadora. Tratamiento 2: se extrajo 50 mL de aire y luego se introdujo 50 mL de CO₂ gasificado por la válvula con ayuda de una jeringa de plástico de 50 mL de capacidad. La incubadora portátil con los medios de maduración, fertilización y cultivo se introdujo dentro un baño María a 38.5°C para completar el desarrollo respectivo. El grupo control se procesó en una incubadora convencional desde la maduración hasta producción de embriones. Los resultados fueron: Maduración 57.04% (81/142) y 60.83% (73/120), fertilización 38.73%(55/142) y 38.33%(46/120) y producción de embriones 18.95%(51/269) y 19.38% (76/392) para la adición de CO₂ a partir de los gránulos efervescentes y adición de CO₂ en forma gasificada respectivamente y los datos sometidos a la prueba de Chi- cuadrado no mostraron dependencia ($p \geq 0.05$). En conclusión la maduración, fertilización y producción de embriones *in vitro* se puede realizar utilizando una incubadora portátil al que se adiciona CO₂ en forma de gránulos efervescentes o en forma gasificada.

Palabras claves: aspiración folicular, maduración, fertilización, embriones

ABSTRACT

The present research work was carried out in the Laboratory of Animal Reproduction of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the National University of Altiplano-Puno. Located at an altitude of 3820 m.s.n.m. and geographically at a Latitude south of 15°49'34.5 "and a west longitude of 70° 00 '43.5" on the Collao plateau. The main objective was to determine the percentage of production of embryos in vitro from the oocytes aspirated from the ovaries of cows slaughtered in the slaughterhouse, inside a portable incubator. For the maturation, fertilization and production of embryos from the oocytes aspirated from the ovaries, we used a portable incubator that fitted a plastic taper that had the following measurements length = 16 cm, width = 11 cm, height = 5.8 cm with a total volume of 500 mL, a cap valve with an 18G 1 1/2 needle attached to a silicone hose with a diameter of 5 mm was fitted to the taper on the cap and a hemostat was used to prevent CO₂ output from inside. The CO₂ was added to the portable incubator in the following ways: Treatment 1: 50 mL of air was previously extracted with the help of a plastic syringe, 5% of CO₂ was added by detachment of 0.21 g of effervescent granules that were in the inside the incubator. Treatment 2: 50 mL of air was extracted and then 50 mL of gasified CO₂ was introduced through the valve with the help of a 50 mL plastic syringe. The portable incubator with the means of maturation, fertilization and culture was introduced into a water bath at 38.5 ° C to complete the respective development. The control group was processed in a conventional incubator from maturation to embryo production. The results were: Maturation 57.04% (81/142) and 60.83% (73/120), fertilization 38.73% (55/142) and 38.33% (46/120) and embryo production 18.95% (51/269) and 19.38 % (76/392) for the addition of CO₂ from the effervescent granules and addition of CO₂ in gasified form respectively and the data submitted to the Chi-square test did not show dependence ($p \geq 0.05$). In conclusion, the maturation, fertilization and in vitro production of embryos can be done using a portable incubator to which CO₂ is added in the form of effervescent granules or in gasified form.

Keywords: follicular aspiration, maturation, fertilization, embryos

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú la crianza bovina mayormente está formado por ganado criollo, solamente el 10% de la ganadería nacional es mejorado y menos del 1% de ésta última cifra es ganado de pedigree. El Departamento de Puno tiene una población de 601 360 vacunos, que representa el 12.3% de la población nacional. Según la calidad genética están distribuidos en 74.1% de ganado criollo, 22.28% ganado cruzado y el 3.62% de ganado Brown Swiss (INEI, 2012).

La distribución de la población por tamaño de las unidades agropecuarias indica que la mayor población departamental se encuentra en poder de los minifundios (60%), medianos (25%) y grandes (15%). Los productores lo utilizan como fuente de ingreso económico, alimenticio a través de los sub-productos como la leche o queso (INEI 2012).

En nacimiento de los primeros terneros de la producción de embriones *in vitro* en ganado vacuno viene de los años de 1982 (Bracket *et al.* 1982). La técnica de la producción de embriones *in vitro* consiste en los siguientes pasos: 1) aspiración de los ovocitos de los folículos de ovarios (de vacas sacrificadas o vacas vivas), 2) maduración *in vitro* de los ovocitos, 3) capacitación de los espermatozoides, 4) fertilización *in vitro*, 5) cultivo de los cigotos, 6) evaluación y/o congelación de los cigotos y 7) transferencia de los embriones a las receptoras (Gordon, 2003). En todo el mundo el comercio los embriones de vacunos producidos *in vitro* se inició a partir de 1992.

La importancia de aplicar esta tecnología reproductiva en la ganadería vacuna en el departamento de Puno, es para realizar el mejoramiento genético rápido en esta especie, en vista de que se utilizarían como donadoras los ovocitos de vacas de alta producción y para la fertilización se aprovecharía el semen de los

toros de alta calidad genética que venden los distribuidores en el departamento de Puno.

En el departamento de Puno producto de la inseminación artificial como instrumento de mejoramiento genético en el ganado vacuno hace tres décadas, una proporción de aproximadamente el 5% de animales han llegado a un mejoramiento, encontrándose vacas de alta producción, donde estas vacas por el inadecuado manejo reproductivo o productivo son eliminadas del hato por presentar infertilidad prolongada o esterilidad, como también las vacas de saca por vejez.

Las vacas llegan al camal para su sacrificio y con la tecnología de producción *in vitro* de embriones, se aprovecharía los ovarios de dichas vacas y transportarlos al laboratorio para la producción de embriones *in vitro*, de esta manera se aprovecharía a estas vacas de alta genética para producir unas cuantas crías vía transferencia de embriones a vacas receptoras.

En el presente trabajo se planteó la producción de embriones *in vitro* en incubadoras portátiles de CO₂ diferente a las incubadoras convencionales de producción de embriones *in vitro*. Estas incubadoras portátiles de CO₂ fueron usadas en la producción de embriones, con la adición de gránulos efervescentes como fuente de CO₂, en vacunos (Suzuki *et al.*, 1999), búfalos (Kandil *et al.*, 1999), cerdos (Fuji *et al.*, 2010).

El presente trabajo de investigación fue conducido para examinar el uso de la adición del CO₂ en forma de gas en una proporción del 5% del volumen a la incubadora portátil modificada, para ver la proporción de maduración y

fertilización y producción de embriones de los ovocitos obtenidos de los ovarios de vacas sacrificada en el camal. Siendo los objetivos generales y específicos:

Determinar el porcentaje de embriones producidos de los ovarios de vacas sacrificadas en el camal, dentro una incubadora portátil.

Por ello se determinó plantear los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el porcentaje de producción de embriones *in vitro* a partir de los ovocitos aspirados de los ovarios de vacas sacrificadas en el camal, dentro una incubadora portátil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el porcentaje de maduración y fertilización de los ovocitos, utilizando una incubadora portátil con adición de CO₂ a partir de colocar gránulos efervescentes.
- Determinar el porcentaje de maduración y fertilización de los ovocitos, utilizando una incubadora portátil con adición de CO₂ en forma gasificada.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Producción de embriones *in vitro*

Para la producción de embriones *in vitro*, los protocolos se ciñen a los eventos fisiológicos de la vaca durante la fase del estro y metaestro y los pasos que se siguen los siguientes:

2.1.1. Recolección de ovarios del matadero

La recolección de ovarios se realiza mediante la intervención del recolector durante el beneficio. Los ovarios se obtienen de vacas en diferentes estados fisiológicos dentro de los 30 min posteriores al sacrificio de los animales. Los ovarios recogidos son colocados en un termo que contiene solución salina (0.9% NaCL), o solución fosfato-tamponada salina (PBS). Estas soluciones contienen generalmente antibióticos como 25 mg/L de kanamicina, o 100 UI/L de penicilina y 100 ug/L de gentamicina (Leibfried and First, 1979).

El transporte de los ovarios al laboratorio, se realiza desde los 30 min a las 6 h. después de la recolección los ovarios se transportan a una temperatura de 30-35°C. Una vez en el laboratorio, los ovarios son lavados repetidas veces en la solución de transporte. Los ovarios son colocados en baño maría a 30°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos (Fry *et al.*, 1997).

2.1.2. Obtención de los ovocitos.

El método de aspiración consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja, ayudado por una jeringa (Carolan *et al.*, 1994).

Se usan agujas de diferentes diámetros (18, 19, y 21-G). Los resultados indican que con la utilización de agujas 18 G, se obtienen el mayor número de ovocitos. Sin embargo la utilización de presiones de succión de 50 a 70 mmHg se recomiendan para obtener el máximo número de ovocitos rodeados por cúmulus compacto (Fry *et al.*1997).

2.1.3. Selección de ovocitos.

La morfología que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios, brindan la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis. Los ovocitos obtenidos en el laboratorio son clasificados y seleccionados para ser madurados *in vitro*, según el aspecto que presenta su citoplasma y las células del cúmulus que lo envuelven, se propone el siguiente esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus. Los ovocitos se pueden clasificar en cuatro categorías: Categoría A =Presentan más de tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie; Categoría B=presentan tres capas compactas de células del cúmulus; Categoría C=se encuentran rodeados por células del cúmulus expandidas y semidesnudos; Categoría D=pertenecen los ovocitos desnudos, para el procedimientos de maduración y fertilización *in vitro* se recomiendan las categorías A y B(Leibfried and First, 1979).

2.1.4. Maduración *in vitro* de los ovocitos.

Esta maduración *in vitro* se realiza colocando a los ovocitos en gotas del medio de maduración en placas petry y luego son introducidas a

incubadoras que se regulan a 38.5°C (temperatura corporal de vaca), que poseen 5% de CO₂ y alta humedad por 22 a 24 horas.

Durante el proceso de maduración tanto *in vivo* como *in vitro* de los ovocitos ocurren una serie de cambios, que permiten la reanudación de la meiosis. Estos eventos deben ocurrir antes de la fertilización y se caracterizan por la expansión de las células del cúmulus, la eliminación del primer corpúsculo polar y la formación de la metafase II (Hyttel *et al.*, 1986). *In vivo*, la hormona FSH es responsable de la inducción de la maduración de los folículos y la hormona LH promueve la reanudación de la meiosis de los ovocitos (Xu *et al.*, 1986).

Las células del cúmulus también desempeñan un papel importante en la maduración de los ovocitos. Estas células aportan nutrientes y energía (piruvato) al ovocito (Donahue and Stern, 1968). También secretan ácido hialurónico a la matriz externa de proteoglicanos. Esta secreción provoca la ruptura de la matriz, lo que trae aparejado el fenómeno denominado expansión del cúmulus, dominado por la acción de la FSH y se caracteriza por el cambio de interacción entre las células del cúmulus y el ovocito (Henseleigh and Hunter, 1985).

2.1.5. Evaluación morfológica de la maduración de ovocitos.

El ovocito maduro tiene una morfología y características definidas, generalmente aceptadas como criterios para evaluar la maduración *in vitro*. De este modo, se considera maduros a aquellos ovocitos que presentan cúmulus mucificado y expandido, presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino y metafase II. A pesar de

ello, la capacidad de los ovocitos para ser fertilizados *in vitro* y continuar el desarrollo normal de los embriones, es probablemente el criterio más adecuado (De Loos *et al.*, 1992). Se toma los siguientes criterios para evaluar la maduración *in vitro* de los ovocitos:

- a. La calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito y la apariencia del citoplasma, son los mejores indicadores del potencial que este posee para la maduración y fertilización *in vitro*.

Por lo tanto se evalúa el grado de expansión y elasticidad de las células del cúmulus de la siguiente manera:

Grado I (+) de expansión y elasticidad del cúmulus, se aprecian células sin elasticidad ni expansión.

Grado II (++) de expansión y elasticidad del cúmulus, donde las células del cúmulus se aprecian con ligera expansión y elasticidad.

Grado III (+++) de expansión y elasticidad del cúmulus, donde las células del cúmulus se aprecian con máxima expansión y elasticidad, considerándolos maduros.

- b. Los ovocitos madurados *in vitro* sufren por un lado un retraso en la migración de los gránulos corticales en la peri ferie del ovocito y presencia de un mayor número de prolongaciones celulares, provenientes de las células de la corona radiata en el espacio perivitelino, lo cual nos hace considerar a la aparición del espacio perivitelino como un criterio para evaluar el grado de maduración citoplasmática de los ovocitos (De Loos *et al.*, 1992)

La morfología del ovocito maduro se caracteriza por la presencia del primer corpúsculo polar en el espacio peri-vitelino, donde a nivel

nuclear los cromosomas presentan la configuración de metafase II, considerándose así maduro (Leibfried and First 1979).

2.1.6. Medios de maduración de ovocitos

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos se utilizaron diferentes medios de cultivo (Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, Tyrodes y Waymouth MB752/1). Todos ellos presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador. En dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones. A pesar de la amplia variedad de medios descrita, el más utilizado es el TCM- 199 (Gliedt *et al.*, 1996).

2.1.7. Suplementos al medio de maduración

Se determinó la importancia de la adición al medio de cultivo (TCM-199) de diferentes concentraciones de hormonas FSH, LH, estrógenos y suplementos como suero fetal. Los resultados obtenidos, demuestran que la adición de estrógenos favorece las tasas de maduración *in vitro* en comparación al aporte de FSH y LH (Stubbings *et al.*, 1991).

Según el trabajo de revisión realizado por Brackett and Zuelke(1993) está claramente establecido, que el medio de cultivo empleado para la maduración *in vitro* de los ovocitos influye significativamente en las tasas de fertilización *in vitro*, El medio de maduración de los ovocitos, es suplementado con suero fetal bovino (SFB), suero de vaca en celo

(SVC) o albúmina sérica bovina (BSA). Estos elementos, favorecen la expansión de las células del cúmulus y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa (Lee *et al.*, 1996).

Otros suplementos utilizados en diferentes concentraciones, son los factores de crecimiento (EGF, IGF-I, IGF-II, TGF α , TGF β y activina,). Estos son elementos que favorecen la maduración de los ovocitos y actúan como agentes mitogénicos sobre las células de la granulosa (Beverset *al.*, 1997). Como se indica anteriormente, las hormonas FSH y LH desempeñan un papel importante en los procesos de maduración *in vivo* y son utilizadas para la maduración *in vitro*. También se colocan, estrógenos, progesterona y hCG, que son diferentes suplementos comúnmente utilizados en los medios de maduración y tienen acción positiva en la maduración *in vitro* de ovocitos (First and Parrish, 1987).

2.1.8. Fertilización in vivo de ovocitos bovinos.

Finalizado el periodo de maduración *in vitro*, los ovocitos madurados se encuentran aptos para ser fertilizados *in vitro*. Tanto para condición *in vivo* como *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 progresar a través de las células del cúmulus y penetrar la zona pelúcida (Yanagimachi, 1981).

Durante la fertilización se procesan a los espermatozoides de la forma similar a los eventos que se producen en el tracto genital de vaca en forma natural y los protocolos consideran los siguientes pasos:

2.1.9. Preparación del semen de toro

En mayor medida, el semen de toro utilizado para la fertilización *in vitro* procede con semen congelado. La preparación del semen de toro congelado, incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crioprotectores, la separación de los espermatozoides motiles de los no motiles y la capacitación espermática (Avery and Greve., 1995). Comprende los siguientes pasos el protocolo:

a. Lavado de los espermatozoides y separación de espermatozoides motiles y no motiles

Al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección. Estas son: lavado por centrifugación, swim-up, gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación (Avery and Greve, 1995).

El lavado por centrifugación resulta ser el método más sencillo de todos. El semen se centrifuga 2 veces a 500g durante 5 a 10 min (Fukuda *et al.*, 1990).

El método de swim-up separa los espermatozoides motiles de los no motiles, basado en la motilidad de los primeros. De este modo, una muestra de semen colocada en el fondo de un tubo que contiene medio de cultivo a 37°C, permitirá después de un tiempo de cultivo, que los espermatozoides motiles se desplacen hacia la superficie del tubo (Parrish *et al.*, 1986).

El percoll está constituido por partículas coloidales de 15 a 30 nm de diámetro cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). El sistema de separación de espermatozoides consiste en la colocación, en un tubo estéril, de 2 gradientes de percoll (55% y 90%) diluido en medio de cultivo Sperm-TALP. El semen se siembra en la parte superior del tubo y se centrifuga a 200g durante 25 min a temperatura ambiente (Avery and Greve, 1995).

El método de filtración en columna con lana de vidrio consiste en la separación de células espermáticas basado en la motilidad de los espermatozoides. La muestra de semen se coloca en la parte superior de un tubo cilíndrico de 10 a 15 cm de altura. Los espermatozoides motiles atraviesan la lana de vidrio y se recogen en el fondo del tubo (Stubbings *et al.*, 1991).

b) Capacitación de los espermatozoides

Se ha establecido que existen diferencias en la tasa de fertilización del semen, proveniente de diferentes sementales (Brackett *et al.*, 1982; Rosenkranz and Holzmann, 1997). Estas variaciones individuales, pueden deberse a diferencias metabólicas características de las células espermáticas, edad del macho y diferencias en los contenidos del plasma seminal o la relación entre el volumen del plasma seminal y el número de espermatozoide (Brackett and Oliphant, 1975; Rosenkranz and Holzmann, 1997). La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica. Durante éste proceso, se produce el retiro del material

que recubre la región acrosómica del espermatozoide dejando libres los receptores que interaccionan con las células del cúmulus y la zona pelúcida del ovocito. Del mismo modo, se han descrito cambios en las propiedades de las membranas espermáticas: aumento del pH acrosomal, alteración en la proporción entre el colesterol y fosfolípidos y aumento en la permeabilidad al calcio (Yanagimachi, 1981).

Para la capacitación de semen congelado de toro, se emplean componentes como la heparina, calcio células del epitelio oviductal, fosfolípidos vasoactivos (Guyader and Chupin, 1991).

Ha sido ampliamente descrita, la efectiva capacidad de unión que tiene la heparina y la concentración óptima de ésta para maximizar el grado de fertilización *in vitro* alcanzado. 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 (Saeki *et al.*, 1995).

2.1.10. Co-cultivo de los ovocitos con las células espermáticas

Una vez que los espermatozoides han sido lavados, seleccionados y capacitados, se realiza el co-cultivo de estos con los ovocitos madurados *in vitro* para realizar la fertilización.

De acuerdo al trabajo de revisión realizado por Brackett and Zuelke (1993), la mayoría de las experiencias llevadas a cabo en fertilización *in vitro*, utilizan básicamente los medios TALP (Tiroides Albumina Lactato Piruvato) y B.O. (Bracket and Oliphant, 1975) para

el lavado y capacitación de los espermatozoides. A su vez, el co-cultivo *in vitro* de los espermatozoides con los ovocitos puede realizarse en un periodo de tiempo corto (6 a 8 h) o bien, un tiempo largo (18 a 24 h.).

2.2.11. Evaluación de la fertilización

En general, se considera fertilizado a aquel ovocito que ha emitido el segundo corpúsculo polar y se visualizan los pronúcleos masculino y femenino y la cola espermática (Del Campo, 1993). Sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de los primeros blastómeros como criterio (Fukui and Ono, 1989; Fukui, 1990).

2.2. Antecedentes de trabajos de producción de embriones en la adición del CO₂ a dispositivos no convencionales

Suzuki *et al.* (1999) para la producción de embriones *in vitro* de vacunos, a partir de los ovocitos aspirados de los ovarios, utilizaron un cajón de plástico de capacidad 0.61 litros como incubadora portátil y adicionaron 0.25 g de gránulos efervescentes como fuente de CO₂. Además probaron la presión negativa (succionado 30 mL de aire) y positiva (adicionando 30 mL de aire). Para la maduración, fertilización y cultivo el cajón de plástico introdujeron a una incubadora a 38.5°C, la maduración de los ovocitos realizaron en 22 h, fertilización por 5 h y cultivo por 7 días. Reportando tras la fertilización un división del 58.5% y tras el cultivo de 7 días el 20.5% de blastocitos.

Kandil *et al.* (1999) recolectaron ovarios de búfalos del matadero y aspiraron los ovocitos de los folículos de 2 a 6 mm de diámetro para la producción de embriones *in vitro*. Utilizaron una caja de plástico de las siguientes medidas largo= 15, ancho=10, alto=4 cm (Vol= 0.61 cm³) como cámara portátil de incubación, por una válvula creada succionaron 200 mL de aire para crear una presión negativa de 200 mmHG y 15.4% de concentración de oxígeno y colocaron un deposito al interior con 0.3 g de gránulos efervescentes para la producción de CO₂ por adición de 5 mL de agua bidestilada por la válvula. La cámara portátil de incubación que contenía las placas de maduración o fertilización o cultivo fueron introducidos en una incubadora a 38.5°C. En su primer experimento de cada ovario contaron el número de folículos, ovocitos aspirados y su clasificación. En un segundo experimento utilizaron espermatozoides de toros con diferentes porcentajes de motilidades para la fertilización y en un tercer experimento determinaron el porcentaje de división de los cigotos y embriones transferibles. Reportando 5.4 folículos por ovario, 2.2 ovocitos por ovario. Posterior a fertilización reportaron el 53.2% de ovocitos en división, a los 8 días de cultivo 28.6% de blastocitos.

Fuji *et al.* (2008), investigaron la producción *in vitro* de embriones de cerdos a partir de los ovocitos y utilizaron una incubadora portátil de CO₂ (caja de plástico largo= 15, ancho=10, alto=5 cm con un Vol= 0.75 cm³) adosado con diferentes tipos de válvulas, crearon una presión negativa de -300 mmHg y concentración del 8 a 10% de O₂ por succión del aire con una bomba y colocaron un deposito al interior de incubadora portátil con 0.3 g de gránulos efervescentes para la producción de CO₂

que se desprendió por adición de 5 mL de agua bidestilada por una las válvulas. La incubadora portátil colocó al interior de una cámara de fierro (estufa) y mantenía en todo momento 38.5°C. Los resultados que obtuvieron después de maduración, fertilización y cultivo fueron: ovocitos madurados en metafase II 45.9%, en división pos fertilización 39.1% y pos cultivo de 8 días 6.7% de blastocitos.

Iwayama *et al.* (2005) para madurar ovocitos de vacunos utilizaron el medio de maduración compuesto de TCM 199 suplementado con 10% de suero fetal, 1mM de glutamina, 0.02 AU/mL de pFSH, 1 ug/mL de estradiol y 75 mg de kanamicina/L. Los ovocitos colocados en 50 uL del medio de maduración y cubierto con aceite mineral en placas petry, colocaron dentro una incubadora portátil de CO₂ (caja de plástico largo= 15, ancho=10, alto=4.5 cm con un Vol= 675 cm³) adosado con diferentes tipos de válvulas, crearon una presión negativa de -300 mmHg y concentración del 8 a 10% de O₂ por succión del aire con una bomba y colocaron un deposito al interior de incubadora portátil con 0.3 g de gránulos efervescentes para la producción de CO₂ que se desprendió por adición de 5 mL de agua bidestilada por una las válvulas. La incubadora portátil de colocaron al interior de una cámara de fierro (estufa) y mantenía en todo momento 39°C. Los ovocitos fueron posterior a la incubación de 24 h fueron fijados y teñidos con orceina para determinar la proporción de maduración nuclear en estado de metafase II y los resultados que obtuvieron fueron: Ovocitos madurados en metafase II 69.2.9%.

Byrd *et al.* (1996) trabajaron con ovocitos ovinos para la producción in vitro de embriones. Colocaron en 2 mL de medio de maduración en tubos de

plástico de fondo redondo de capacidad de 4 mL y equilibrado en una atmosfera de 5% de CO₂, este medio luego fue cubierto con 2 mL de aceite mineral, finalmente el tubo con todo el contenido fue cerrado herméticamente y colocado dentro un incubadora portátil a 39°C por 24 h. Un siguiente tratamiento realizaron colocando los ovocitos en el medio de maduración dentro un tubo sin equilibración con CO₂ y sin cubierta de aceite mineral los tubos con el contenido fueron colocados dentro un incubadora portátil a 39°C por 24 h. Para la fertilización utilizaron semen congelado/descongelado en pellet, mezclando directamente al medio de fertilización 425 uL(TL HEPES) que contenían los ovocitos maduros en una cantidad de 1×10^6 de espermatozoides por mL, los ovocitos y espermatozoides fueron incubados por 18 a 20 h dentro una incubadora convencional. El cultivo de los presuntos cigotos realizaron en gotas de 50 uL de medio MBMOC adicionado con 1 uL de células oviductales, cubiertos con aceite mineral, dentro una incubadora convencional a 39°C con una atmosfera del 5% de CO₂, alta humedad por 7 días. Los resultados que lograron fueron: Tratamiento en tubo cerrado 68.14% de maduración, 58.62 de fertilización y 3.06% de embriones. En tubo abierto 66.96% de maduración, 55.69 de fertilización y 1.85% de embriones.

Vajta *et al.* (1996) en la producción de embriones *in vitro* de ganado vacuno, utilizando protocolos convencionales para la criopreservacion respectiva reportaron: 7.6 ovocitos aspirados por ovario con un rango de 6.6 a 8.4.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que se encuentra en la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, a una altitud de 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" en la meseta del Collao (SENAMHI, 2005).

3.2. Material biológico

Para el presente trabajo se utilizaron ovocitos de ovarios de vacas que se beneficiaron en el camal de Azoguini. Las vacas previamente fueron identificadas antes del sacrificio para utilizarlos los ovarios de estas vacas en forma, para registrar las siguientes características de los ovarios y los ovocitos de la siguiente manera:

Tabla 1: Registro del número de folículos en la superficie de los ovarios y número de ovocitos recuperados por ovario.

Vacas	Número de folículos por ovario	Número de ovocitos recuperados (%)
n= 21	Ovario D=... Ovario I= ...	Ovario D=... Ovario I= ...

Factores de inclusión: Se seleccionaran vacas adultas y vacías de la raza Brown swiss.

Factores de exclusión: Se evitaran vacas gestantes y vacas con procesos patológicos en los ovarios.

Tabla 2: Registro de la calidad de ovocitos, por ovario por vaca.

Vacas	Número de ovocitos/ovario	Calidad de ovocitos			
		A	B	C	D
n= 21	Ovario D=... Ovario I= ...				

Tabla 3: Registro de la maduración y fertilización de los ovocitos

Tratamiento	Nro. De ovocitos	Nro de ovocitos madurados (%)	Nro de ovocitos fertilizados (%)
Gránulos			
Adición			

3.3. Preparación de los medios

PBS Buffer

Se preparó la solución a partir de los reactivos siguientes y con pH 7.4 y la fórmula para 500 mL fue:

- 1). Agua ultra pura 400 mL
- 2). NaCl 4 g
- 3). KCl 0.1 g
- 4). Na₂HPO₄ 0.72 g
- 5). KH₂PO₄ 0.12 g
- 6). Aforar hasta 500 mL
- 7). Se ajustó pH 7.4 con HCl
- 8). Se conservó a 4 - 5°C

PBSm – Medio de aspiración y lavado de ovocitos

Para preparo 50 mL se mezcló:

- | | |
|----------------------------|----------|
| D-PBS (+) (Sol Stock) | 48.50 ml |
| Gentamicina | 50 ug/mL |
| SFb (suero fetal bov) (3%) | 1.5 ml |

Se filtró con poro de 0,22 µm.

TCM-199 – Medio de maduración

Se preparó cada vez 10 mL de medio de maduración de la siguiente manera:

Para 10 mL de medio de maduración:

- TCM-199 (c/sales de Earl, 0.25 Mm Hepes)	0.151 g
- Piruvato de sódio	0.022 g
- H ₂ CO	0.022 g
- Gentamicina	50 ug/mL
- Suero de vaca celo (5%)	0.5mL
- eCG	10 U.I/mL
- hCG	5 U.I/mL

Filtrar (0.22 μ)

Se ajustó el pH de 7.2 a 7.4.

Medio de fertilización**Medio stock tyrode lactato modificado SPERM-TALP**

<u>Compuesto</u>	<u>Final mM</u>	<u>/100 mL</u>
NaCl	100	584 mg
KCl	3.1	23 mg
NaHCO ₃	25.0	210 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.3	4 mg
Hepes	10.0	238 mg
Gentamicina		25 ug/mL 100 uL
Lactato de sódio (60%)	21.6 uL	368 uL
Rojo fenol (1%)	L/mL	100 uL

Se agregó estos dos componentes al final, agitando suavemente la solución

CaCl ₂ .2H ₂ O	2.0	31 mg
--------------------------------------	-----	-------

MgCl ₂ .6H ₂ O	0.4	8 mg
--------------------------------------	-----	------

Se determinó: el pH y ajusto a 7.4

Osmolaridad y ajusto a 290-300 mOsm

Se filtró: con filtros de 0.22 um

Se conservó a: 4°C en frascos estériles por dos semanas.

Sperm-Talp solución de trabajo

El día de su uso se preparó:

		Cantidad /mL
Sperm-Talp (stock)		50 mL
BSA Fraccion V	6mg/mL	300 mg
Piruvato de sodio (stock)	10 uL/mL	500 uL
Gentamicina	25 ug/mL	125 ug

Se filtro: com filtro de 0.22 um

Medio stock tyrode lactato modificado FERT-TALP

FERT-TALP	Final mM	50 mL
NaCl	114	333.00 mg
KCl	3.2	11.75 mg
NaHCO ₃	25.0	105.2 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.4	2.76 mg
Gentamicina	25 ug/mL	1225ug
Rojo fenol (1%)	1 uL/mL	50 uL

Se agregó estos dos componentes al final, agitando suavemente la solución

CaCl ₂ .2H ₂ O	2.0	15 mg
--------------------------------------	-----	-------

MgCl ₂ .6H ₂ O	0.5	5 mg
--------------------------------------	-----	------

Se determinó: el pH y ajusto a 7.4

Osmolaridad y ajusto a 290-300 mOsm

Se filtró: con filtros de 0.22 um

Se conservó a: 4°C en frascos estériles por dos semanas.

Fert-Talp solución de trabajo

El día de su uso se preparó:

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

Se filtro: com filtro de 0.22 um

3.4. Equipos y materiales de laboratorio

- Incubadora de CO₂
- Baño maría
- Cámara de flujo laminar
- Vortex
- Centrifuga
- Congeladora

- Refrigeradora
- Balanza analítica
- Platina calentadora
- Microscopio estereoscópico
- Microscopio invertido
- Bomba de CO₂
- Estufa
- Micro dispensador de 10 µL
- Jeringas de tuberculina
- Jeringas de 5, 10, 20 y 60 mL.
- Tips de 10 µL,
- Placas Petri de 2 pocillos
- Cámara portátil (taper)
- Aguja hipodérmica de 18G
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcón
- Probetas graduadas de 10, 50 y 100 mL
- Instrumental mínimo de disección

3.5. Metodología

Todos los pasos realizados en esta tecnología de producción de embriones *in vitro* se realizó a 38 °C.

3.5.1. Transporte de los ovarios de vacas beneficiadas en el camal

Los ovarios de vacas beneficiadas fueron colectados en bolsas de polietileno que contenían solución salina (0.9% NaCl) + antibióticos

(100 U.I./mL de penicilina + 1 mg/mL de estreptomina). Se colocaron dentro de un termo con agua caliente de 30 a 35°C

Los ovarios fueron transportados hacia el laboratorio dentro de 2 a 3 horas.

3.5.2. Obtención de ovocitos

En el laboratorio los ovarios fueron lavados 2 veces con suero fisiológico+ antibióticos temperado a 35°C y secados con papel toalla. Los ovarios fueron fijados a nivel del hilio con una pinza para proceder con la aspiración de los ovocitos. La aspiración de los ovocitos se realizó por punción de los folículos de 3 a 8 mm con ayuda de una aguja 18G X 1.5 adosado a una jeringa de 5 mL. La aspiración se realizó con una presión de 12 a 15 mL/min (recorrido del embolo de la jeringa)

El contenido de la aspiración (fluido folicular + ovocitos) fueron vertidos a un tubo de ensayo de 12mL de capacidad, que estaba protegido a 37°C dentro de un baño María, dejando el tubo en reposo por 10 min para separar el sobrenadante.

Seguidamente se extrajo el sobrenadante con ayuda de un tip largo adosado a una jeringa de 10 mL.

El sedimento se vertió a una placa Petri (35 x 10mm), que previamente fue cuadrulado en su base. Se procedió a enjuagar el tubo con PBS + 10% Suero Fetal Bovino (SFB). El contenido de la placa petry se dejó en reposo 2 a 3 min, para luego continuar con la búsqueda de ovocitos con ayuda de un microscopio estereoscopio a un aumento de 25 X.

Con ayuda de un tip adosado a una jeringa de tuberculina se aspiraron cuidadosamente los ovocitos para trasladarlos a otra placa petry que contenía 3 mL de PBS + 10% SFB para realizar la evaluación y selección de los ovocitos.

3.5.3. Clasificación de ovocitos

Los ovocitos fueron clasificados teniendo en cuenta el número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma y la categorización empleada fue de acuerdo a la recomendación por (Leibfried and First, 1979): Categoría A = Presentan más de tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie; Categoría B= presentan tres capas compactas de células del cúmulus.

3.5.4. Maduración *in vitro*

Se preparó y se adecuo de acuerdo a las recomendaciones de los autores y el protocolo de maduración fue el siguiente:

El medio de maduración TCM + 10% de suero fetal + 10 U.I de eCG + 5 U.I. hCG + 10 uL de una mezcla de antibióticos y antimicótico (A 5955 Sigma) +, 5 UI de heparina + 50 uL fluido folicular, se filtró a través de una membrana de 0.22 um.

El medio de maduración se coloca en una placa petry de 2 pozos una cantidad de 0.5 mL se cubrió con aceite mineral.

La incubación para la maduración de los ovocitos se realizó dentro un taper (Suzuki *et al.* 1999), donde se realizó modificaciones. El taper de plástico tenía las siguientes medidas largo= 16 cm, ancho= 11 cm,

alto= 5.8 cm con un volumen de 500 mL, al taper se le acondiciono en la tapa una válvula de conexión (aguja 18G 1¹/₂ unido a una manguera de silicona con un diámetro de 5 mm y como seguro se utilizó una pinza hemostática para evitar la salida del CO₂ de su interior).

La placa petry que contenía el medio de maduración con los ovocitos, fueron colocados dentro el taper (incubadora portátil), tapado y fijado con seguros de presión.

Toda la incubadora portátil se introdujo dentro un baño María a 38.5°C por 24 h para la maduración de los ovocitos y la humedad (90%) en el interior de la incubadora portátil fue desprendida, por la adición de 5 mL de agua bidestilada a través de la válvula a un depósito de plástico (diámetro= 35 mm y alto= 20 mm).

Adición del CO₂ para el tratamiento 1: Previamente se extrajo 50 mL de aire con ayuda de una jeringa de plástico (50 mL de capacidad), través de válvula. El CO₂ (aproximadamente el 5%) fue por desprendimiento de 0.21 g de gránulos efervescentes (Sal de andrews). Los gránulos se colocaron dentro el depósito de plástico y a través de válvula se adiciono 5 mL de agua bidestilada, liberándose el CO₂ en el interior de la incubadora portátil.

Adición del CO₂ para el tratamiento 2: Previamente en el dispositivo de plástico colocado dentro la incubadora portátil se vertió 5 mL de agua bidestilada por la válvula. También se extrajo 50 mL de aire y se introdujo 50 mL de CO₂ por la válvula con ayuda de una jeringa de plástico (capacidad 50 mL). El CO₂ procedió de un balón portátil

(botella de plástico de 600 mL de capacidad, acondicionada con dos válvulas de salida y entrada). En la botella vacía y seca se echó 5 g de gránulos efervescentes (Sal de Andrews), se aspiró todo el aire para crear un ambiente negativo dentro la botella y por una de las válvulas se vertió 10 mL de agua bidestilada y por efervescencia de los gránulos se desprendió el CO₂ inflando nuevamente a la botella.

Una vez tapado la incubadora portátil y asegurado la válvula con una pinza hemostática mosquito se colocó dentro un baño María que el agua cubría a la incubadora portátil por encima de 3 cm. La temperatura del baño María estuvo a 38.5°C por 24 h para su correspondiente maduración de los ovocitos y con permanente supervisión.

El grupo control se procesó dentro una incubadora convencional desde la maduración hasta producción de embriones.

3.5.5. Evaluación de la maduración de los ovocitos

Después de 24 h de incubación, la placa petry con los ovocitos se sacó y observaron bajo un microscopio estereoscópico a 40X. Para la evaluación de maduración de los ovocitos se tomó en cuenta el grado de expansión de las células del cúmulo y la visco-elasticidad del cúmulo. La expansión se midió como el % de separación de las células del cúmulo de los ovocitos. La visco-elasticidad se midió como la formación de un filamento al ser recogido con una pipeta todo el conjunto de los ovocitos. Ambas características se calificaron subjetivamente en una escala arbitraria de 0 a 3 (Avery *et al.* 2003).

Para ratificar la maduración los ovocitos fueron desnudados. En tubo de ensayo de capacidad de 12 mL se vertió 0.5 mL de PBS+10% de suero fetal y los ovocitos se sumergieron colocaron en su interior. El contenido se vorterizo al máximo de rpm (10 000 rpm) por 45 segundos (Vajta *et al.*1996).

El contenido del tubo vorterizado se vertió sobre una placa petry que contenía 3 mL de PBS+10% de suero fetal y bajo la lupa de un microscopio estereoscopio a 25X y luego a 100X se contabilizo en los ovocitos maduros por presencia del primer corpúsculo polar.

3.5.6. Fertilización *in vitro*

a) Preparación y capacitación de los espermatozoides.

Para la fertilización *in vitro* se utilizó el protocolo de Parrish *et al.* (1988) y adecuado por Coleman *et al.* (2007). Se utilizaron espermatozoides congelados de toro con fertilidad conocida en la inseminación artificial y para la capacitación de los espermatozoides se realizó los siguientes pasos:

Se extrajo una pajilla de semen congelado del termo criogénico con la ayuda de una pinza larga, para descongelar la pajilla se introdujo en baño maría a 37°C por 30 s.

Los espermatozoides descongelados se vertieron a un tubo de ensayo que contenía 1 mL de SPERM TALP, el tubo se cerró con una tapa de goma y a través de la tapa y con ayuda de una jeringa de tuberculina se adiciono 0.6 mL de CO₂. El tubo con mezcla se

colocó dentro el baño maría (38.5°C) por espacio de 25 min, para que los espermatozoides vivos naden en la superficie (swim up).

Después del tiempo se extrajo 800 uL de la superficie de la mezcla con ayuda de una jeringuilla de 1 mL. Esta muestra se pasó a otro tubo de ensayo y se centrifugo por 10 minutos a 1600 rpm y se descartó el sobrenadante.

La porción rica en espermatozoides (sedimento o pellet) fueron re-suspendidos con 200 uL de FERT TALP.

La concentración espermática se ajustó a 1×10^6 espermatozoides/mL, estando listo para su uso en la fertilización de los ovocitos maduros.

b) Fertilización *in vitro*

Se prepararon 500uL del medio de fertilización con FERT TALP en placas petry de dos pozos y se cubrieron con aceite mineral. La incubadora portátil (taper) con las placas del medio fertilización y suplementados con CO₂, introdujeron en baño maría para su equilibración al menos por espacio de 2 horas para su equilibrar de la temperatura y el pH de cultivo a 38.5°C.

Posterior a las 2 horas de equilibración los ovocitos maduros se lavaron tres veces en gotas de FERT TALP y se colocaron al medio de fertilización. Al medio de fertilización se suplementaron con 4uL de espermatozoides 4uL de la combinación de penicilamina, epinefrina e hipotaurina.

La placa petry se acondiciono en la incubadora portátil y CO₂ correspondiente y se incubo en baño maría (38.5°C) por espacio de 18 horas para su fertilización.

3.5.7. Evaluación de la fertilización

Previamente los presuntos cigotos después de la fertilización se desnudaron con el mismo procedimiento para evaluar la presencia del corpúsculo polar.

Los presuntos cigotos desnudados fueron cultivados en 500 uL de medio de cultivo SOFaa suplementado con 50 uL de suero fetal y cubiertos con aceite mineral, las placas pasaron a la incubadora portátil con las mismas condiciones de CO₂ y humedad por 48 h dentro el baño maría.

Posterior a las 48 h de cultivo la placa se sacó de la incubadora portátil y los cigotos se evaluación bajo la lupa de un microscopio estereoscopio a 25X y a 100X registrando los cigotos por la división de los blastómeros.

3.5.8. Cultivo y evaluación de embriones

Los cigotos para continúen su desarrollo se les cambio el medio cada 48 h y se cultivaron dentro la incubadora portátil y baño maría, con las mismas condiciones para la maduración de ovocitos.

A los 7 días del cultivo post fertilización los embriones se evaluaron con la ayuda de un microscopio estereoscopio a 25X y 100X, registrando los embriones de acuerdo a estado de desarrollo y calidad (Mórula, blastocito).

3.6. Método estadístico.

La maduración de los ovocitos fue evaluado tomando en cuenta 2 variables, expansión, visco-elasticidad de las células del cumulus ophurus y la presencia del corpúsculo polar. Entre los tratamientos y separadamente para cada variable se obtuvieron medidas de tendencia central como el promedio, proporción. Para encontrar la variabilidad entre tratamientos se sometió a un análisis de varianza (ANVA) conducido como Diseño Completamente al Azar, siendo el modelo aditivo lineal el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Variable respuesta (Expansión y visco-elasticidad).

μ = Es la media poblacional y es constante común.

T_i = Efecto de i – ésimo tratamiento.

ε_{ij} = Es el error experimental.

Las variables de estudio en proporción (presencia de folículos sobre la superficie del ovario, calidad de los ovocitos, presencia de corpúsculos polares, cigotes y embriones) se analizaron por la prueba de Chi-cuadrado.

Siendo la ecuación siguiente:

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

Dónde:

θ_i = Frecuencia observada.

e_i = Frecuencia esperada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Folículos sobre la superficie del ovario

La tabla. 4 muestra los resultados del número de folículos terciarios de 3 a 8 mm de diámetro sobre la superficie de los ovarios derecho e izquierdo de 21 vacas (anexo 2), donde en promedio se registró 10.85 folículos en la superficie del ovario derecho y en el izquierdo de 10.71 folículos. Que sometidos a la prueba de T no muestran diferencia ($p \geq 0.05$). El porcentaje de recuperación de los ovocitos posterior a la aspiración de los folículos con ayuda de una aguja 18 G adosada a una jeringa de 5 mL y una presión aproximada de 10 a 15 mL por minuto fueron 41.11% (111/270) de ovocitos recuperados para el ovario derecho y 34.66% (78/225) de ovocitos recuperados para el ovario izquierdo, porcentajes sometidos a la prueba de Chi-cuadrado indican que son independientes ($p \geq 0.05$). Además sobre la superficie de los ovarios se observaron en 15 vacas la presencia de cuerpos lúteos de 15 mm de diámetro y folículos dominantes con diámetros mayores a 10 mm, en 3 vacas solo se registraron la presencia de cuerpo lúteos, en 2 vacas la presencia de folículos dominantes y 1 vaca la presencia de un folículo pre-ovulatorio con un tamaño de 18 mm de diámetro.

La morfología de los ovarios descritos indican que todas las vacas estaban ciclando, por la presencia de los cuerpos lúteos, folículos dominantes y folículo pre-ovulatorio. Especialmente la presencia del folículo dominante indica la presencia de la onda folicular anovulatorio que se presentan en el ciclo estral en la vaca.

Tabla 4: Numero de folículos en la superficie del ovario y ovocitos recuperados

Ovario	Total de folículos	Nro. de folículos/ovario	Total de ovocitos recuperados	Nro. de ovocitos/ovario
Ovario derecho	270	10.85	111(41.1%)	5.28
Ovario izquierdo	225	10.71	78(34.6%)	3.71
Total	495	21.56	189(38.2)	8.99

Reportes en la literatura sobre el total de folículos en la superficie del ovario en búfalos fueron 5.4 (Kandil et al., 1999) y contrastados con los 10.85 o 10.71 folículos en los ovarios de las vacas en el presente trabajo son superiores. Esta diferencia se debería a la especie, en vista que en el presente estudio se trabajó con vacas que tenían diferentes grados de cruce con la raza Brown swiss.

Realizando la colección de los ovocitos de ovarios de vacas (*Bos taurus*) lograron obtener en promedio 7.6 ovocitos por ovario (Vajta et al., 1996) que difieren con los resultados obtenidos en el presente estudio siendo en menor cantidad (5.28 o 3.71 ovocitos por ovario). Diferencia que se debería a la destreza de los técnicos que realizan la aspiración folicular, en vista de que el autor indica que labor de producción de embriones in vitro que realiza en su laboratorio tiene varios años. Mientras que en el presente estudio la aspiración folicular se realizó para presente estudio que duro varios meses y se comenzó sin mucho adiestramiento.

4.2. Calidad de los ovocitos recuperados

La tabla 5 muestra los resultados de la clasificación de los ovocitos aspirados del ovario derecho e izquierdo durante el trabajo. Del ovario derecho se aspiraron 69/111(62.16%) ovocitos de categoría A, 16/11(14.41%) de

categoría B, 14/111(12.61%) de categoría C y 12/111(10.81%) de categoría D. Del ovario izquierdo se aspiraron 42/78(53.85%) ovocitos de categoría A, 15/78(19.23) de categoría B, 11/78(14.10%) de categoría C y 10/78 (12.82%) de categoría D (Anexo 3). Que sometidos a la prueba de chi-cuadrado no existe dependencia ($p \geq 0.05$).

Tabla 5: Número de ovocitos y calidad recuperados de los ovarios

Ovarios	Nro. de ovocitos	Categoría A	Categoría B	Categoría C	Categoría D	Nro. de ovocitos/ovario
Derecho	111	69(62.16)	16(14.41)	14(12.61)	12(10.81)	5.28 (1 a 12)
Izquierdo	78	42(53.85)	15(19.23)	11(14.10)	10(12.82)	3.71 (0 a 10)
Total	189	111(58.7)	31(16.4)	25(13.2)	22(11.6)	

Contrastando con resultados publicados en la literatura los porcentajes de ovocitos de categoría A, B, C y D, son en mayor proporción comparados con los reportados por Fischer et al. (2000) como clase I excelente 27.4%, clase II bueno 17.3%, clase III desnudo 14.4% y clase IV atresicos 40.9%. Variación que se debería a que los autores indican que estos resultados son de 2 experimentos, donde utilizan para la aspiración una aguja 18 G x 1 1/2 y una presión 30 mL/min y los ovarios eran de procedencia de diferentes razas y cruces de vacunos de carne y leche. Mientras que en el presente trabajo para la aspiración se utilizó una aguja 19 G x 1 y una presión de aproximadamente 15 mL/min. Donde el menor diámetro de la aguja penetró en todo el folículo y la menor presión aplicada favoreció en la recolección de los ovocitos.

Así mismo contrastados con los resultados reportados por Fry *et al.* (1997) indican haber encontrado ovocitos de clase A (18%), B(13%), C(8%), D(5%) y E(2%). Esta diferencia menor en la proporción lograda se debería a que

los autores para la aspiración utilizaron una aguja 17 G (1.48 mm de diámetro interno) y de largo de 35 cm y unido a una manguera de teflón de 60 cm, este extremo libre unido a una bomba de aspiración, que durante la aspiración la succión fue continua a una presión de 25 mL/min. La menor proporción de ovocitos reportado por los autores se debería a que la distancia que tenía que recorrer el ovocito colectado era largo (espacio muerto) y la presión constante aplicado por la bomba de aspiración, probablemente hayan destrozado gran cantidad de ovocitos.

También en la literatura existen resultados similares a los del presente estudio donde Sasamoto *et al.* (2003) reportan ovocitos con el 59.2% para la clase I, 21.8% para la clase II, 17.3% para la clase III y 1.7% para la clase IV. Los autores utilizaron una aguja 18 G de 60 cm de longitud, conectado a un tubo cónico de plástico de 50 mL y este a la vez unido por una manguera de silicona de 100 cm a una bomba aspiradora, donde la aspiración folicular fue a un flujo continuo de 7.5 mL/min. Los resultados similares se deberían a que la aspiración folicular en el presente trabajo se realizó a 15 mL/min y de forma controlada, presión que favoreció la captación de los ovocitos y evito la destrucción de las células del cumulus.

Aspirando ovarios de búfalos con agujas 18 G, unido a una jeringa de 10 mL, Kandil *et al.* (1999) reportan el 60.9% buenos, 17.8% regulares y 21.4% pobres. Contrastados con los resultados del presente estudio se asemejan, a pesar que la nomenclatura de calificación es diferente. Esta similitud en los resultados del presente estudio se debería que la aspiración folicular de los ovarios se realizó con una aguja 19 G y adosada a una jeringa de plástico de 5 mL.

4.3. Maduración y fertilización

La tabla 6 muestra la proporción de ovocitos maduros (anexo 1) posterior a la adición de CO₂ a la incubadora portátil, en forma de gránulos para el tratamiento 1 y en forma de volumen de CO₂ para el tratamiento 2 y uso de una incubadora convencional para el grupo control. La maduración *in vitro* de los ovocitos, rutinariamente se miden por la expansión del cumulus y visco-elasticidad en una escala de 0 a 3 (Avery *et al.* 2003). En el presente estudio la maduración de ovocitos se evaluó a las 24 h posteriores de cultivo estando todavía los ovocitos dentro la placa de maduración, se registraron subjetivamente la expansión de las células del cumulus alrededor de los ovocitos y visco-elasticidad de este cumulus. Colocándoles la escala que les correspondía. La tabla 3 muestra la expansión y visco-elasticidad de 2.66, 2.48 y 2.62 para el tratamiento 1, 2 y control respectivamente y sometidos al ANVA no muestran diferencia ($p \geq 0.05$). Además la maduración de los ovocitos fue medido por la presencia del primer corpúsculo siendo 57.04% (81/142), 60.83% (73/120) y 69.47% (91/131) para el T1, T2 y control respectivamente y sometidos a la prueba de Chi cuadrado no muestran dependencia ($p \geq 0.05$). La vortización realizada para observar la presencia del corpúsculo provocó la pérdida o destrucción de los ovocitos en número de 11 (7.18%), 16 (11.76%) y 13 (9.02%) en los T1, T2 y control respectivamente.

Tabla 6: Proporción de ovocitos madurados y fertilizados

Tratamiento (suplemento de CO ₂)	Nro. de ovocitos (5 réplicas)	Expansión y visco-elasticidad	Proporción de maduración por presencia del corpúsculo polar	Proporción de fertilización por presencia de 2 células o mas
T1 adición de gránulos	153	2.66	57.04% (81/142)	38.73%(55/142)
T2 adición de CO ₂	136	2.48	60.83% (73/120)	38.33%(46/120)
Incubadora convencional	144	2.57	69.47% (91/131)	48.09%(63/131)

Mientras que la proporción de ovocitos fertilizados y medidos por la presencia de los pro-núcleos o blastómeros fueron del 38.73% (55/142), 38.33%(46/120) y 48.09%(63/131) para el T1, T2 y control respectivamente, resultados sometidos a la prueba de Chi-cuadrado no muestran dependencia ($p \geq 0.05$).

El parámetro de maduración evaluado por expansión y visco-elasticidad en el presente estudio, no se pudo comparar con resultados de otros investigadores debido a que los laboratorios de producción de embriones in vitro rutinariamente toman como referencia este parámetro. Mientras por la presencia del primer corpúsculo polar como medida de la maduración de los ovocitos reportan Dong *et al.* (2001) la maduración de los ovocitos en 85% en metafase II o presencia del corpúsculo polar, autores que utilizan una incubadora portátil, donde el medio de cultivo es el CR1aa y la adición de hormona del crecimiento. Varisanga *et al.* (2002) reportan una maduración de ovocitos del 83.3% en una incubadora portátil. También Iwayama *et al.* (2005) reportan el 69.6% de ovocitos con la presencia del primer corpúsculo polar y maduración nuclear, dentro una incubadora portátil muy parecido utilizado en el presente trabajo. Resultados contrastados con el 57.04 y 60.83% de maduración de los ovocitos del presente estudio son superiores.

Esta superioridad se puede explicar que los autores colocaron dentro de la incubadora portátil toda la mezcla del CO₂ 5% y O₂ 8-10% con una negativa de -300 mmHg. Tratando de imitar el ambiente negativo que existe dentro en el oviducto y útero (Fisher and Bavister, 1993), factor que favoreció la maduración de los ovocitos.

La literatura reporta resultados de fertilización de ovocitos en incubadoras no convencionales y entre estos se tiene. Olivier *et al.* (1998) reportan el 84.3%(2 células) de ovocitos desarrollados a dos días post inseminación. Este desarrollo lo realizaron utilizando un baño María, colocando un tubo de plástico de 10 mL con 500 uL de maduración y 30 a 35 ovocitos. El tubo y su contenido fueron gasificados dentro de bolsas de plástico con una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de aire sintético a un flujo de 40 mL/min. La bolsa gasificada fue sellada y colocada dentro una incubadora convencional por 60 min para lograr el pH de cultivo a 38.5°C. Posterior a la equilibración el tubo fue sacado de la bolsa y cerrado herméticamente y fue introducida dentro el baño María según sea el caso para la maduración, fertilización y cultivo. Contrastando con los resultados obtenidos en el presente estudio, el 84.3% de 2 células es superior a la presencia de 2 células o más del 38.73%(55/142) y 38.33%(46/120) para el tratamiento 1 y 2 respectivamente.

Esta diferencia se debería probablemente a que la equilibración realizada con presión de 40 mL/min del gas mezclado y con el cierre hermético, lograron el pH del medio requerido. Mientras que en el presente estudio la adición de CO₂ por los gránulos efervescentes o el volumen de CO₂ adicionado no lograron equilibrar el pH adecuado. Además algunas veces se

observó que de la incubadora portátil (taper) cerrado se vio saliendo algunas burbujas perdiéndose algo del CO₂ introducido, que no llevo al medio a un pH de cultivo adecuado.

Comparando los resultados del presente estudio de fertilización por la presencia de 2 células o más del 38.73%(55/142) y 38.33%(46/120) para el tratamiento 1 y 2 respectivamente y la literatura reportada (Palma et al., 1999) lograron el 75.1% el día 2 con 2 o más células. Esta diferencia mayor se debería a que los autores la maduración, fertilización y cultivo lo realizaron dentro de bolsas que fueron llenadas con mezcla de gases y cerradas herméticamente y luego colocadas dentro una incubadora convencional no gasificada, pero la temperatura de cultivo fue 38.5°C. Esta diferencia mayor se explicaría como indican los autores que la condición ambiental de la bolsa cerrada proporcionaba un pH, temperatura y humedad durante el cultivo y podría optimizar la proporción del desarrollo del embrión. Mientras que en presente estudio si existía algo de fuga de CO₂ por lo que no se optimizo los factores anteriores indicados.

La fertilización por la presencia de la división celular, utilizando incubadoras portátiles con la adición de CO₂ en forma de gránulos efervescentes y con presión negativa. Pero en presente estudio se utilizó una incubadora portátil sin la presencia presión negativa debido a que la altura de 3870 msnm posee una presión de 460 mmHg y a nivel de la costa se tiene una presión de 760 mmHg.

Hace aproximadamente 2 décadas los investigadores reportan la producción de embriones en incubadoras no convencionales en incubadoras portátiles de CO₂ con presión negativa. Así Suzuki *et al.* (1999) reportan el 72.6% de

división celular, Kandil *et al.* (1999) indican haber logrado una división del 53.2% a partir de ovocitos de búfalos y Dong *et al.* (2001) reportan el 63.5%. Resultados superiores comparados con encontrados en el presente estudio. Se explicaría que los autores en sus medios de fertilización y cultivo utilizaron sueros de diferentes orígenes (vaca en celo, vaca super-ovulada), además incluyeron factores de crecimiento (hormona de crecimiento, insulina). Mientras que en el presente estudio se utilizó como factor de crecimiento el suero fetal.

4.4. Producción de embriones

La tabla 7 muestra la producción de embriones (anexo 4) por tratamientos, adición de CO₂ en gránulos y volumen de CO₂ a la incubadora portátil y posterior cultivo de los presuntos cigotos por 7 días en el medio cultivo SOFaa(fluido oviductal de ovino sintético más aminoácidos). Donde los resultados por tratamiento fueron para la adición de gránulos 18.95% (51/269) de embriones y para el tratamiento de adición de CO₂ en volumen fue 19.38%(76 /392) de embriones. De los 51 los embriones del tratamiento de adición de gránulos se observaron 8 mórulas (grado 1= 6, grado = 2), blastocito inicial 22 (grado 1 = 13, grado 2 = 9), Blastocitos 15 (grado 1= 7, grado 2 = 8), Blastocitos expandidos 6 (grado 1= 5, grado = 1). Además se observaron 4 embriones detenidos con 4 blastómeros y 1 embrión con 8 blastómeros, que no se consideraron como producción de embriones.

De los 76 embriones del tratamiento con adición de CO₂ fueron: mórulas 9 (grado 1= 7, grado 2= 2), blastocito inicial 41 (grado 1= 26, grado 2 = 16), blastocito 22 (grado 1 = 10, grado 2 = 8, grado 3 = 4), blastocito expandido 4 (grado 1 = 4). Además de encontraron 2 embriones con dos blastómeros,

1 embrión con 4 blastómeros, que no se consideraron como producción de embriones.

En el grupo control de los 71 embriones producidos en la incubadora convencional fueron:

Tabla 7: Producción de embriones a los 7 días post fertilización (%)

Tratamiento (suplemento de CO ₂)	Nro. de ovocitos	Cigotos(con pro núcleos, 3 días post inseminación)	Embriones en diferentes estados (7 días de cultivo)
Gránulos	269	38.28%(103/269)	18.95%(51/269)
Gasificada	392	37.24%(146/392)	19.38% (76/392)
Control	289	49.82%(144/289)	24.56%(71/289)

Los resultados de este estudio demuestran que en una incubadora portátil, adicionando el CO₂ en diferentes formas se produce embriones en proporciones ligeramente disminuidos que cuando se utiliza una incubadora convencional. La literatura reporta resultados de producción de embriones de forma no convencional, como Suzuki *et al.* (1999) reportaron el 72.6% de división embrionaria y el 29.6% de embriones en estado de blastocito a los 7 días post inseminación. Los autores utilizaron una incubadora portátil de metal que fue eléctricamente calentado y mantenido a una temperatura de 38°C. Las incubaciones de los ovocitos, fertilización y cultivo de embriones fueron ejecutadas en pequeñas cajas de plástico y colocadas dentro la incubadora. Dentro un dispositivo adicionó gránulos efervescentes y al mezclar con 5 mL de agua liberaron CO₂. Que contrastados con los resultados del presente estudio que se procesaron de forma parecida los porcentajes encontrados son inferiores. La diferencia se debería a que los autores al cultivo adicionaron insulina, que favoreció el desarrollo de los

embriones. La insulina se encuentra en el oviducto, útero durante el desarrollo embrionario en las hembras y es un factor mito génico razón que reflejan en la mayor cantidad de embriones.

Kandil *et al.* (1999) reportaron el 28.6% de blastocitos, evaluando a los 8 días post cultivo respectivamente. El sistema de cultivo que utilizaron fue una incubadora portátil y colocaron en su interior cajas de plástico gasificado con gránulos efervescentes para la liberación de CO₂. Comparados los resultados del presente estudio son superiores en cuanto a la división embrionaria y producción de blastocitos. Esta diferencia se debería a que en este estudio dentro las cajas de plástico se crearon una presión negativa (-200 mmHg) removiendo el aire con una bomba y disminuyendo así la concentración de O₂. Factor que favoreció el desarrollo embrionario, en vista de que en estudios indican que el tracto genital de las hembras tiene presión negativa en el oviducto y durante la transferencia de los embriones del oviducto al útero (Fisher and Bavister, 1993). Los autores ejecutaron la maduración, fertilización y cultivo de embriones en presión negativa parecido al tracto genital.

Vajta *et al.* (1997) lograron un 45% blastocitos a los 8 días de evaluación, realizando todo el procedimiento de maduración, fertilización y cultivo dentro de bolsas gasificadas y estas se colocaron en un sistema de cajas de doble pared, calentado por agua circulante (tipo submarino). Resultado alto frente a los obtenidos en el presente estudio. Esta diferencia se atribuiría a que los autores cultivaron los embriones sobre la capa de granulosa formado espontáneamente en las placas de maduración. Las células de la granulosa favorecen al embrión en su desarrollo.

También otras investigaciones lograron la producción de embriones en sistemas no convencionales, reportan Palma *et al.* (1999) y lograron a los 7 días de evaluación el 32.2% de blastocitos. La producción de embriones realizaron para probar una simple incubación transportable, que consistió en colocar las placas de maduración, fertilización y cultivo dentro de bolsas, a las que se les adiciono la mezcla de gases 5% de CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂, las bolsas fueron herméticamente selladas y colocadas dentro una incubadora convencional no gasificada a 38.5 °C. Comparadas con los resultados del presente estudio, esta producción de embriones reportados son mayores, esto debido a que los mismos autores atribuyen que el ambiente dentro la bolsa (pH, temperatura y humedad) durante el proceso de maduración, fertilización y cultivo podrían optimizar la proporción del desarrollo de los blastocitos.

Utilizando otra modalidad de producción de embriones, Olivier *et al.* (1999) reportaron el 23.1% de blastocitos evaluados a 7 días post cultivo. Los autores colocaron los medios de maduración, fertilización y cultivo junto con los ovocitos/cigotes dentro un tubo de plástico de 10 mL de capacidad. Los tubos abiertos fueron gasificados dentro bolsas con un flujo de 40 mL/min por 2 min que contenían la mezcla de gases 5% de CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂ y cerrado por 60 min para lograr el pH de cultivo a 38.5°C. Después de la equilibración las bolsas fueron abiertas y los tubos fueron sellados y colocados dentro baño Maria a 38.5 °C. Esta proporción de producción de embriones es ligeramente superior al del presente estudio debido a la utilización de la mezcla de gases por los autores pretendieron imitar el ambiente del oviducto y el útero. Mientras que en el presente estudio para

producción de embriones solo se colocó el 5% de CO₂, por la adición en los diferentes tratamientos, factor que probablemente no favoreció mucho la producción de embriones.

V. CONCLUSIONES

La maduración y fertilización de los ovocitos de vacunos utilizando la incubadora portátil con adición de CO₂ a partir de los gránulos efervescentes fue: 57.04% (81/142) de maduración por la presencia del primer corpúsculo polar y el 38.73%(55/142) de fertilización por la presencia de 2 o más células en división.

La maduración y fertilización de los ovocitos de vacunos utilizando la incubadora portátil con adición de CO₂ a partir de la adición en forma gasificada fue: 60.83% (73/120) de maduración por la presencia del primer corpúsculo polar y el 38.33%(46/120) de fertilización por la presencia de 2 o más células en división.

La producción de embriones evaluados a los 7 días post cultivo, producidos en una incubadora portátil, a partir de los ovocitos aspirados de los folículos de ovarios, de vacas sacrificadas en el camal fue: 18.95%(51/269) para la adición de CO₂ a partir de gránulos efervescentes y 19.38% (76/392) para la adición de CO₂ en forma gasificada.

VI. RECOMENDACIONES

La producción de embriones se puede realizar utilizando una incubadora portátil adicionando CO₂ en forma de gránulos efervescentes o en forma gasificada en el Altiplano.

Se requiere el uso de otros suplementos al medio de cultivo para incrementar la cantidad de embriones producidos.

Se requiere construir un laboratorio específico para la producción de embriones in vitro en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

VII. REFERENCIAS

- Avery, B., & Greve, T. (1995). Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*, 44, 871-878.
- Avery, B., Strøbech, L., Jacobsen, T., Bøgh, I., & Greve, T. (2003). In vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology*, 59(3-4):987-99.
- Bevers, M., Dieleman, R., Van den Hurk, R., & Izadyar, F. (1997). Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* , 47; 13-22.
- Brackett, B., & Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod*, 12; 260-274.
- Brackett, B., & Zuelke, K. (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39; 43-64.
- Brackett, B., Bousquet, D., Boice, M., Donawick, W., Evans, J., & Dressel, M. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology Reproduction*, 23:147-158.
- Byrd, S., Flores, G., & Applewhite, A. (1996). In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology* , 47; 857-864.
- Carolan, C., Monaghan, Gallager, P., & Gordon, I. (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* , 41; 1061-1068.

- Coleman, N., Shagiakhmetova, G., Lebedeva, I., Kuzmina, T., & Golubev, A. (2007). In vitro and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology*, 67: 1053-1059.
- De Loos, F., Maurik, P., Van Beneden, T., & Kruij, T. (1992). Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol.Reprod.Develop*, 31; 208-214.
- Del Campo, M. (1993). Fertilización in vitro (Vol. Vol.1). Argentina: Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC).
- Donahue, R., & S, S. (1968). Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate in vitro. *J. Reprod. Fert*, 17; 395-404.
- Dong, Y., Varisanga, M., Mtango, N., Aono, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (2001). Improvement of the culture conditions for in vitro production of cattle embryos in a portable CO2 incubator. *Reprod Dom Anim*, 36; 313-318.
- First, N., & Parrish, J. (1987). In vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, 151-165.
- Fischer, A., Bernal, D., Gutierrez-Robayo, C., & Rutledge, J. (2000). Estimates of heterosis for in vitro embryo production using reciprocal crosses in cattle. *Theriogenolgy*, 54; 1433-1442.
- Fisher, B., & Bavister, B. (1993). Oxigen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil*, 99; 673-679.
- Fry, R., Niall, E., Simpson, T., Squires, T., & Reynolds, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, 47; 977-987.

- Fuji, A. K., Tanihara, F., Ito, A., Hanatake, K., Kikuchi, K., Nagai, T., & Otoi, T. (2008). In vitro maturation and development of porcine oocytes cultured in a straw or dish using a portable incubator with CO₂ chamber. *Reprod. Dom. Anim*, 45; 61.
- Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K., & Toyoda, Y. (1990). Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to blastocyst stage. *Biol.Reprod*, 42; 114-119.
- Fukui, Y. (1990.). Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development* , Vol. 26, 40-46.
- Fukui, Y., & Ono, H. (1989). Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 86, 501-506.
- Gliedt, C., Rosenkrans, D., Rorie, R., Munyon, A., Pierson, J., Miller, G., & Rakes, J. (1996). Effects of media, serum, oviductal cells and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. *J. Dairy Sci*, 79; (4). 536-542.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos (2nd ed.)*. : Cabi Publising Cambridge.
- Guyader, C., & Chupin, D. (1991). *Therigenology*. Capacitation of fresh bovine spermatozoa on bovine epithelial oviduct cel I monolayers, 36; 505-511.

- Henseleigh, H., & Hunter, A. (1985). In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. *J. Dairy Sci*, 68; 1456-1462.
- Hyttel, P., Xu, K., Smith, S., & Greve, T. (1986). Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert*, 78; 615-625.
- INEI. (2012). Instituto Nacional de Estadística e Informática. Resultados. Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario. Ministerio de Agricultura. Lima, Perú.
- Iwayama, H., Ishikawa, H., Ohsumi, S., & Fukui, Y. (2005). Attempt at in vitro maturation of Minke Whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes using a portable CO₂ incubator. *J. Reprod. Dev*, 51; 69-75.
- Kandil, O., Abdoon, A., Murakami, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (1999). New technique a portable CO₂ incubator, for the production of in vitro fertilized Egyptian Buffalo embryos. *J. Reprod. Dev*, 45; 315-320.
- Lee, E., Fujii, Y., & Fukui, Y. (1996). A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* , 45(6);1151-1162.
- Leibfried, M., Critser, E., Parrish, J., & Fist, N. (1989). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31: 6174.
- Olivier, N., Palma, G., & Alberio, R. (1999). In vitro production of bovine embryos in water bath. *Theriogenology* , 58; 247 abstrac.

- Palma, G., Olivier, N., Alberio, R., & Brem, G. (1999). In vitro development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. *Theriogenology*, 58; 344 abstrac.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, Vol. 25, pp. 591-600.
- Phillips, P. (1988). In vitro fertilization in cattle. *College of veterinary medicine. Univ. of Missouri- Columbia*, 1; 1-19.
- Rosenkranz, C., & Holzmann, A. (1997). The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci*, 46(1-2) 47-53.
- Saeki, K., Nagao, Y., Hoshi, M., & Nagai, M. (1995). *Theriogenology* . Effects of heparin, sperm concentration and bull variationon in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein –free medium, 43; 751-759.
- Sasamoto, Y., Sakaguchi, M., Katagiri, S., Yamada, Y., & Takahashi. (2003). The effects of twisting and tipe of aspiration needle on efficiency of transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle. *J. Vet. Med. Sci*, 65 (10); 1083-1086.
- Stubbings, R., & Wosik, G. (1991). Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization . *Theriogenology*, 35; 276.
- Suzuki, T., Sumantri, C., Khan, N., Murakami, M., & Saha, S. (1999). Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for in vitro production of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 53; 149-157.

- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., & Callesen, H. (1996). Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology*, 45; 683-689.
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., & Callesen, H. (1997). The submarine incubation a new tool, for in vitro embryo culture a technique report. *Theriogenology*, 48: 1379-1385.
- Varisanga, M., Dong, Y., . Mtango, N., & Suzuki, T. (2002). Comparison of the effects of using standard and simple portable CO2 incubators on the in vitro development competence of bovine embryos reconstituted by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 58; 77-86.
- Xu, K., Greve, T., Smith, S., & Hyttel, P. (1986). Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet. Scand*, 27; 505-519.
- Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, New York, NV, pp. 81-182.

ANEXOS

Anexo 1

Tratamiento 1: Adición de gránulos efervescentes en la incubadora portátil Sobre la maduración de los ovocitos

Repetición	Nro. de ovocitos	Expansión y visco-elasticidad	Presencia de corpúsculo polar
Placa 1	23	2.5	11
Placa 2	36	2.8	19
Placa 3	27	2.5	14
Placa 4	31	2.8	17
Placa 5	36	2.7	20
	153	Media 2.66	81(52.94%)

Tratamiento 2: Adición de CO₂ en la incubadora portátil Sobre la maduración de los ovocitos

Repetición	Nro. de ovocitos	Expansión y visco-elasticidad	Presencia de corpúsculo polar
Placa 1	21	2.5	13
Placa 2	34	2.8	12
Placa 3	32	2.5	19
Placa 4	28	2.6	14
Placa 5	21	2.0	13
	136	Media 2.48	71(52.20%)

Tratamiento 3: Incubadora convencional en la maduración y fertilización de los ovocitos

Repetición	Nro. de ovocitos	Expansión y visco-elasticidad	Presencia de corpúsculo polar
Placa 1	25	2.7	14
Placa 2	34	2.5	18
Placa 3	35	2.5	16
Placa 4	29	2.8	17
Placa 5	21	2.6	15
	144	Media 2.62	80(55.55%)

ANEXO 2: Número de Folículos por ovario (Folículos de 2 a 8 mm)

Nro. de Vaca	Ovario derecho	Ovario Izquierdo	Observaciones
1	16	6	OI cuerpo lúteo y OD 2 folículos dominantes
2	10	12	OI cuerpo lúteo
3	11	10	OD cuerpo lúteo OI 2 folículos dominantes
4	8	7	OD cuerpo lúteo OI folículo dominante
5	19	6	OI cuerpo lúteo OD 4 folículos > 8 mm
6	4	13	OD cuerpo lúteo OI folículo dominante
7	14	5	OD 2 folículos dominan OI cuerpo lúteo
8	10	6	OI cuerpo lúteo OD 2 folículos dominantes
9	6	8	OI folículo dominante OD cuerpo lúteo
10	15	10	OI cuerpo lúteo OD 2 folículos dominantes
11	7	12	Sin cuerpo lúteo y sin folículo dominante
12	13	11	OI cuerpo lúteo OD 3 folículos dominantes
13	10	14	OI cuerpo lúteo y folículo dominante
14	8	17	OI 2 folículos domin OD cuerpo lúteo
15	7	6	OD folículo dominante y cuerpo lúteo
16	12	11	OD 2 folículos dominantes
17	10	9	OD cuerpo lúteo
18	11	7	OD cuerpo lúteo
19	9	8	OD folículo pre-ovulatorio
20	22	7	OD cuerpo lúteo
21	48	40	OI cuerpo lúteo OD folículo dominante
Total	270	225	
Promedio	12.85	10.71	
Rango	4 a 48	5 a 40	

ANEXO 3: Número de ovocitos y calidad recuperados de los ovario

Vaca	Ovario derecho				Ovario izquierdo			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	3	1	2	1	2	0	0	0
2	2	2	0	1	2	0	0	1
3	2	3	0	0	1	1	0	0
4	2	2	1	0	1	0	0	1
5	4	0	3	0	0	0	0	2
6	1	0	0	0	1	0	3	0
7	4	1	0	0	0	0	0	0
8	2	0	0	1	1	1	0	1
9	2	0	0	0	0	0	0	2
10	4	0	0	2	4	0	0	0
11	2	0	0	2	3	2	2	0
12	4	2	0	0	3	0	0	1
13	2	0	1	0	3	1	0	1
14	3	0	0	2	3	3	0	0
15	3	0	0	0	2	0	0	0
16	4	0	0	1	2	0	1	1
17	4	1	2	1	3	1	1	0
18	4	2	2	1	2	1	1	0
19	3	0	0	1	2	1	0	0
20	7	2	3	0	2	1	1	0
21	7	0	0	1	5	3	2	0
Sub-total	69	16	14	12	42	15	11	10
Total		111				78		
Promedio		5.28				3.71		
Rango		1 a 12				0 a 10		

ANEXO 4: Producción de embriones a los 7 días de cultivo**Tratamiento 1: Adición de gránulos efervescentes en la incubadora portátil en la producción de embriones**

Repetición	Nro. de ovocitos	Cigotos(con pro núcleos)	Embriones en estados diferentes
Placa 1	44	2cel= 9, 4cel= 5, >2 cel=1	M=1, Bi=3, B=2, BX=1
Placa 2	53	2cel=11, 4cel=6, >4cel=2	M=2, Bi=6, B=3
Placa 3	47	2cel=14, 4cel= 6	M=3, Bi=3, B=2, BX=2
Placa 4	62	2cel=17, 4cel=7	Bi=3,B=7 BX=3
Placa 5	63	2cel=19, 4cel=5, >4cel=1	M=4, Bi=5, BX=1
	269	38.28%(103/269)	18.95%(51/269)

M=morula, Bi= Blastocito inicial, B= Blastocito, BX= Blastocito expandido.

Tratamiento 2: Adición de CO₂ en la incubadora portátil Sobre la producción de embriones

Repetición	Nro. de ovocitos	Cigotos(con pro núcleos)	Embriones en estados diferentes
Placa 1	56	2cel=17, 4cel= 6	M=5, Bi=2, B=2
Placa 2	64	2cel=15, 4cel=8, >4cel=2	M=3, Bi=8, B=2, BX=1
Placa 3	57	2cel=13, 4cel=8, >4cel=2	Bi=9, B=2, BX=2
Placa 4	48	2cel=13, 4cel= 7	M=2 Bi=5
Placa 5	52	2cel=15, 4cel=3, >4cel=2	M=2, Bi=4, B=2, BX=1
Placa 6	67	2cel=11, 4cel=6, >4cel=1	M=3, Bi=8, B=1, BX=1
Placa 7	48	2cel= 7, 4cel= 10	M=6, Bi=3, B=2
	392	37.24%(146/392)	19.38% (76/392)

Tratamiento 3: Incubadora convencional
Producción de embriones

Repetición	Nro. de ovocitos	Cigotos(con pro núcleos)	Embriones en estados diferentes
Placa 1	48	2cel=13, 4cel=7, >4cel=2	M=2, Bi=7, B=3
Placa 2	53	2cel=19, 4cel= 5	M=2, Bi=4, B=3, BX=1
Placa 3	46	2cel=15, 4cel=5, >4cel=3	M=3, Bi=6, B=2
Placa 4	57	2cel=13, 4cel=10, >4cel=3	Bi=2, B=7, BX=1
Placa 5	44	2cel= 17, 4cel= 7	Bi=5, B=6
Placa 6	41	2cel=16, 4cel=8, >4cel=1	M=2, Bi=7, B=4, BX=3
	289	49.82%(144/289)	24.56%(71/289)

ANEXO 5
FIGURAS



Figura 1: Colección de ovarios de vacas en el camal



Figura 2: Transporte de ovarios

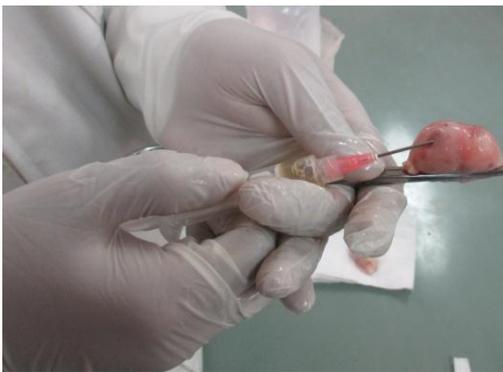


Figura 4: Aspiración de folículos



Figura 3: Preparación de medios



Figura 6: Maduración de ovocitos



Figura 5: Incubadora portátil

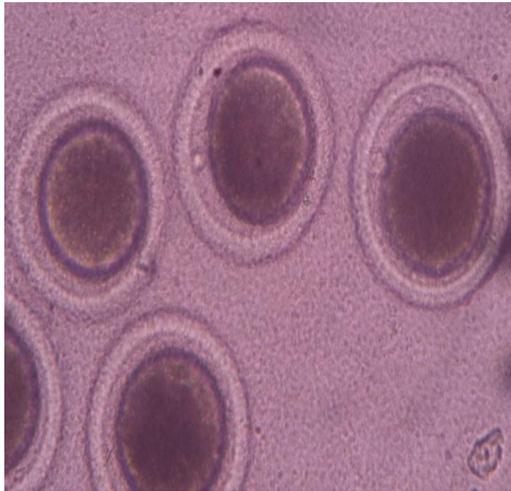


Figura 7: Ovocitos maduros con corpúsculos

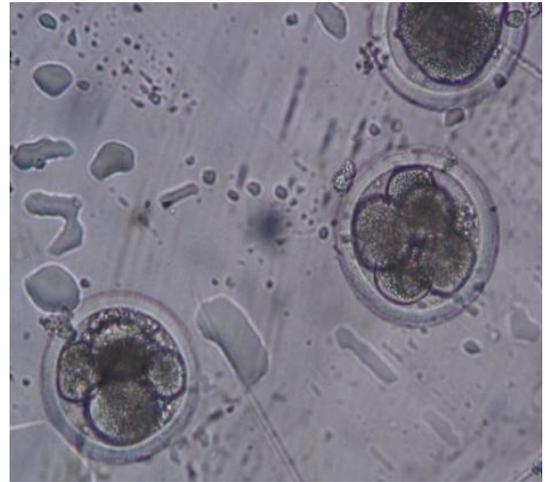


Figura 8: Embriones a los 3 días post fertilización.

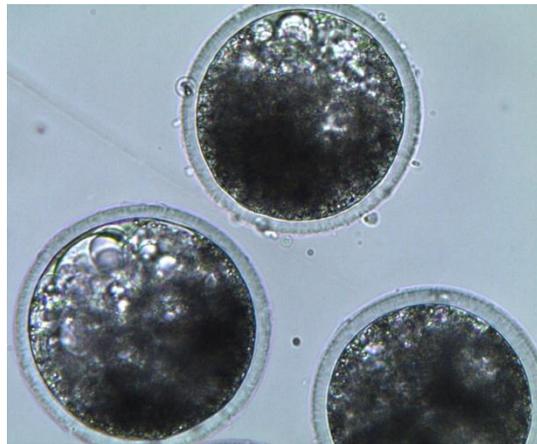


Figura 9: Embriones de 7 días.