

2010

## **Evaluación de la viabilidad y el desarrollo de embriones bovinos obtenidos por fertilización in vitro incubados en oviductos ovinos**

Camilo Andrés Díaz Pazmiño  
*Universidad de La Salle, Bogotá*

Felipe Andrés Hurtado Bernal  
*Universidad de La Salle, Bogotá*

Follow this and additional works at: [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria)



Part of the [Veterinary Medicine Commons](#)

---

### **Citación recomendada**

Díaz Pazmiño, C. A., & Hurtado Bernal, F. A. (2010). Evaluación de la viabilidad y el desarrollo de embriones bovinos obtenidos por fertilización in vitro incubados en oviductos ovinos. Retrieved from [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria/223](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/223)

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

UNIVERSIDAD DE LA SALLE  
Facultad de ciencias agropecuarias  
Programa de Medicina Veterinaria



**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y EL DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS  
OBTENIDOS POR FERTILIZACIÓN *IN VITRO* INCUBADOS EN OVIDUCTOS OVINOS**

Trabajo de grado para optar al título de Médico Veterinario

CAMILO ANDRÉS DÍAZ PAZMIÑO  
FELIPE ANDRÉS HURTADO BERNAL

Bogotá, Colombia

2010

UNIVERSIDAD DE LA SALLE  
Facultad de ciencias agropecuarias  
Programa de Medicina Veterinaria



**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y EL DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS  
OBTENIDOS POR FERTILIZACIÓN *IN VITRO* INCUBADOS EN OVIDUCTOS OVINOS**

Trabajo de grado para optar al título de médico Veterinario

CAMILO ANDRÉS DÍAZ PAZMIÑO

Cód. 14051052

FELIPE ANDRÉS HURTADO BERNAL

Cód. 14041101

Director:

Dr. CESAR AUGUSTO GÓMEZ VELÁSQUEZ

Bogotá, Colombia

2010

## APROBACIÓN

**DIRECTOR**

---

Dr. CESAR AUGUSTO GÓMEZ VELÁSQUEZ

**JURADO**

---

Dr. JOSE CARLOS COELHO DE OLIVEIRA

**JURADO**

---

Dr. FERNANDO AGUSTÍN ESCOBAR CALLEJAS

## DIRECTIVOS

RECTOR	Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo
VICERECTOR ACADÉMICO	Hno. Fabio Humberto Coronado Padilla
VICERECTOR DE PROMOCIÓN Y DESARROLLO HUMANO	Hno. Carlos Alberto Pabón Meneses
VICERECTOR ADMINISTRATIVO	Dr. Eduardo Ángel Reyes
VICERECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA	Hno. Manuel Cancelado Jiménez
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS	Dr. Luis Carlos Villamil Jiménez
DIRECTOR PROGRAMA MEDICINA VETERINARIA	Dr. Pedro Pablo Martínez Méndez

## **COMPROMISO**

Los trabajos de grado no deben contener ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primero que todo a Dios padre, por darme las capacidades físicas y mentales para concluir este proyecto y esta etapa de mi vida, agradezco a mis padres, Milciades Díaz y Doladaly Pazmiño, por su amor incondicional e infinito apoyo en cada paso de este proyecto, a mis hermanos Vanessa, Manuel y Fausto por confiar y creer en mí, a Alicia por su apoyo incondicional y consejos siempre útiles, a los Doctores, César Gómez, Susana Castañeda por su compromiso y entrega e igualmente a todas las personas que hicieron realidad esta tesis. MIL GRACIAS.

**Camilo Andrés Díaz Pazmiño**

Agradezco en primer lugar a Dios, por iluminarme y ser mi guía y mi luz, por darme la fuerza necesaria y las capacidades para salir adelante. A mis padres Felipe A. Hurtado y Teresa Bernal, por su esfuerzo, dedicación y apoyo incondicional, a mis hermanas y demás familiares por siempre confiar en mí, a los Doctores Cesar Gómez y Susana Castañeda por su dedicación, entrega y apoyo al proyecto y a todos los que hicieron que este sueño sea hoy una realidad, MUCHAS GRACIAS.

**Felipe Andrés Hurtado Bernal**

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
1. MARCO TEÓRICO	2-25
1.1. EL OVIDUCTO	2-4
1.2. DESARROLLO EMBRIONARIO	2-8
1.3. CULTIVO EMBRIONARIO IN VITRO	8-9
1.3.1. Materiales de planta de sacrificio	9-10
1.3.2. Aspiración folicular	10-11
1.3.3. Maduración de los oocitos	11
1.3.4. Fertilización in vitro (FIV)	11-12
1.3.5. Preparación del espermatozoide	12
1.3.6. Maduración embrionaria	12-13
1.4. CULTIVO DE EMBRIONES IN VIVO VS IN VITRO	13-17
1.5. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE OOCITOS	17-21
1.6. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES	21-25
2. MATERIALES Y MÉTODOS	26-34
2.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	29-30
2.1.1. Técnica quirúrgica	30-34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35-49
3.1. RECOLECCIÓN DE OOCITOS	35-38
3.2. MADURACIÓN IN VITRO (MIV)	38-41
3.3. RECUPERACIÓN DE EMBRIONES	42-44
3.4. IN VITRO VS. IN VIVO	44-49
CONCLUSIONES	50



RECOMENDACIONES	51
LISTA DE REFERENCIAS	52-56
ANEXOS	57-63

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Efecto del sistema de incubación en el grado de criosupervivencia en diferentes momentos.	15
Tabla 2. Porcentajes de preñes al día 30, 60 y perdidas embrionarias obtenidos por métodos in vitro e in vivo	16
Tabla 3. Desarrollo de gametos bovinos de 4 y 8 células madurados y fertilizados in vitro y luego incubados in vivo en oviductos bovinos frente a gametos producidos in vitro totalmente	16
Tabla 4. Recuperación de embriones bovinos después de 5 días en el oviducto ovino.	18
Tabla 5. Criterios de selección de los CCOs inmaduros	19
Tabla 6. Criterios de selección de los CCOs	20
Tabla 7. Efecto de la calidad morfológica del oocito inmaduro en las tasas de maduración <i>In Vitro</i> , fertilización, división y formación de mórula/blastocisto.	22
Tabla 8. Criterios de evaluación morfológica de embriones	22
Tabla 9. Estado de desarrollo embrionario de las estructuras recuperadas sin importar la calidad embrionaria.	45

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ovario bovino con su respectivo oviducto sin disectar rodeado por su mesosalpinx	4
Figura 2. Tracto reproductivo bovino	4
Figura 3. Desarrollo temprano del embrión bovino y transporte en el oviducto	5
Figura 4. Desarrollo temprano del embrión bovino	6
Figura 5. Estado de desarrollo preimplantacional in vitro en bovino	7
Figura 6. Esquema del proceso de producción in vitro de embriones	9
Figura 7. Ovarios procedentes de planta de sacrificio bovina	10
Figura 8. Aspiración folicular con jeringa en laboratorio	10
Figura 9. Pasos para la preparación del semen por medio de la técnica de gradiente Percoll	12 21
Figura 10. Comparación morfológica de blastocistos totalmente producidos in vitro	14
Figura 11. Porcentaje de presentación de apoptosis en embriones de equinos, porcinos, ovinos, caprinos y bovinos cultivados in vitro e in vivo	17 25
Figura 12. Oocitos calidad 1	19
Figura 13. Oocitos parcialmente desnudos	20
Figura 14. Complejos Cumulo-oocito de excelente calidad	21
Figura 15. Blastocisto expandido, MCI (Masa celular interna) bien distribuida	23
Figura 16. Blastocistos expandidos GIII, MCI distribuida de forma irregular	24
Figura 17. Mórulas compactas, GI-II	24
Figura 18. Blastocisto Protruido GI	25
Figura 19. Selección de animales	26
Figura 20. Resumen gráfico de la metodología implementada	27
Figura 21. Ovarios de matadero inmersos en solución de mantenimiento, introducidos en la máquina baño de maría a 37 °C	27
Figura 22. Colocación de oocitos en las diferentes cajas de Petri	28
Figura 23. Materiales usados para la descongelación del semen bovino criopreservado	29

Figura 24. Percoll antes de la adición de espermatozoides y después de la centrifugación	29
Figura 25. Ubicación y preparación del animal para el procedimiento quirúrgico	30
Figura 26. Inicio del procedimiento quirúrgico	31
Figura 27. Ovarios de oveja en su posición anatómica normal	31
Figura 28. Ovario con cuerpos lúteos y cuerpos hemorrágicos	32
Figura 20. Paso del catéter guía, catéter con los embriones cargados y transferencia de los embriones directamente en el oviducto	33
Figura 30. Técnica quirúrgica de recuperación embrionaria y recolección de medio de lavado en caja de petry	34
Figura 31. Aspiración en el laboratorio	36
Figura 32. Calidades de oocitos aspirados de ovarios de hembras sacrificadas	36
Figura 33. Oocitos GI	37
Figura 34. Oocitos GII	38
Figura 35. Oocitos GIII	38
Figura 36. Porcentajes de embriones que se utilizaron para MIV y descartados	39
Figura 37. Porcentaje de oocitos que clivaron después de la FIV según la calidad de los mismos	40
Figura 38. Número y calidad de oocitos FIV clivados y no clivados según la calidad de los mismos	40
Figura 39. Embriones de 2 - 4 células obtenidos por FIV de oocitos calidad 1	41
Figura 40. Número de embriones que se implantaron en cada grupo y número de embriones que se recuperaron	42
Figura 41. Técnica quirúrgica de recuperación embrionaria y recolección de medio de lavado en caja de petry	43
Figura 42. Calidad y cantidad de embriones recuperados in vitro vs in vivo (grupos de ovejas)	44
Figura 43. Embriones degenerados in vitro e in vivo	46
Figura 44. Blastocitos expandidos Grado I de los dos grupos in vitro e in vivo	47
Figura 45. Blastocitos compactos Grado 1 de los dos grupos in vitro e in vivo	48
Figura 46. Mórula grado 2 incubada en oviductos ovinos	48
Figura 47. Zona pelucida Grado 2 recuperada de oviducto de una oveja	49

## RESUMEN

Este estudio pretendía evaluar la utilización de biomodelos en el desarrollo embrionario teniendo en cuenta la viabilidad y calidad de los mismos. Se produjeron 214 embriones bovinos en el laboratorio a partir de 1052 oocitos aspirados de 74 ovarios provenientes de hembras bovinas sacrificadas en planta de sacrificio.

Los embriones fueron divididos en 5 grupos en partes iguales, un grupo se desarrollaron totalmente en el laboratorio, y los restantes se incubaron hasta el día 6 en oviductos de ovinos criollos de lana. El día 6 se procedió a recuperar los embriones por medio de la técnica quirúrgica y ha ser evaluados y comparados en cuanto a calidad basados en la morfología con el grupo de laboratorio.

Se concluyo que la técnica de incubación in vivo de embriones bovinos en oviductos ovinos permite el desarrollo de embriones de altísima calidad. El grupo de embriones producidos totalmente en el laboratorio alcanzo un número mayor de estructuras grado 1 frente a los embriones incubados in vivo, 18 (40%) y 3 (8.8%) respectivamente. Los embriones incubados en oviductos ovinos alcanzaron mayor número de estructuras grado 2 que los producidos totalmente en el laboratorio, 3 (8.8%) y 1 (2.2%) respectivamente.

Palabras clave: cultivo in vivo, cultivo in vitro, embriones.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the use of biomodels in embryonic development, taking into account feasibility and quality of embryos. 214 bovine embryos were produced in the laboratory from 1052 oocytes of 74 ovaries aspirated from female cattle slaughtered in the slaughter plant.

The embryos were divided into 5 equal groups, one group fully developed in the laboratory, and the remaining were incubated until day 6 in oviducts of native sheep. Day 6 is sought to recover the embryos through the surgical technique has to be evaluated and compared in terms of quality based on morphology with the lab group. It was concluded that the technique of in vivo incubation of bovine embryos in sheep oviducts allows the development of high quality embryos.

The group of embryos produced entirely in the laboratory reached a larger number of structures grade 1 compared to embryos incubated in vivo, 18 (40%) and 3 (8.8%) respectively. The embryos incubated in sheep oviducts reached greater number of structures grade 2 than the laboratory group, 3 (8.8%) and 1 (2.2%) respectively.

Key words: cultured in vivo, cultured in vitro, embryos.

## INTRODUCCIÓN

La genética animal es de suma importancia para lograr el éxito en las explotaciones ya que a partir de este parámetro y su relación con el medio ambiente, se obtienen resultados fenotípicos deseables o indeseables. La herramienta más adecuada para implantar genética en una explotación son las biotecnologías reproductivas que en los últimos años se han caracterizado por grandes avances en los procedimientos dirigidos a la reproducción asistida en humanos y mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. Así mismo, en la actualidad la clonación y la transgénesis cobran gran importancia existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas (Hansen, 2006).

Una técnica de gran valor y la cual hace parte de estas biotecnologías, es la producción *in vitro* de embriones bovinos, que aseguren una alta tasa de preñez cuando son transferidos a hembras receptoras. Sin embargo, es importante señalar que el desarrollo de embriones bovinos, cultivados *in vitro*, ha presentado una serie de dificultades, particularmente en cuanto a la calidad de los mismos. Es difícil determinar si el problema se debe directamente a condiciones no óptimas de cultivo de los embriones, o si se debe a la reducción del desarrollo de competencia de los oocitos madurados y fertilizados *in vitro*. Ambos aspectos podrían combinarse y producir embriones con desarrollo atrasado y presencia de anomalías, lo que conllevaría a una reducción de su viabilidad.

En general, el cultivo *in vitro* se asocia a una reducida velocidad de desarrollo y viabilidad embrionaria, efectos que son más marcados a medida que aumenta el tiempo de cultivo. Un hallazgo constante, bajo ciertas condiciones de cultivo *in vitro*, es el cese del desarrollo embrionario o "bloqueo" del desarrollo. En un estudio preliminar, 89 embriones caprinos de 1-8 células no sobrepasaron el estado de mórula cuando se cultivaron en medio de Whitten o Ham F10 suplementados con albúmina sérica bovina, o suero fetal bovino (Bosch, 2000).

Para esta problemática se ha recurrido a técnicas que se conocían en el pasado como es la utilización de embriones fertilizados *in vitro* cultivados en oviductos de hembras receptoras, independientemente de la especie, esta técnica permite alcanzar mayor calidad de embriones y se asegura un porcentaje mayor de supervivencia embrionaria (Enright, 2000).

La problemática asociada a la baja calidad de los embriones cultivados *in vitro* resulta en una limitación comercial, sobre todo en los rangos de crío supervivencia debido a que los embriones producidos en laboratorio tienen mayor cantidad de gotas de lípidos intracelulares lo cual causa degeneración del embrión pos congelación a esto se le puede sumar la gran posibilidad de sufrir de apoptosis, convirtiéndose el cultivo de embriones en oviductos de hembras receptoras en una opción viable en miras de aumentar la calidad de los embriones, esto ha sido demostrado en estudios con grandes resultados por lo que esta técnica ha tomado fuerza para producir embriones de altísima calidad (Wetscher y Havlicek, 2005).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilización de biomodelos en el desarrollo embrionario teniendo en cuenta la viabilidad y calidad del mismo.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la calidad de oocitos obtenidos por medio de Aspiración Folicular (OPU), los cuales serán fertilizados *In Vitro*.
- Documentar al finalizar el proceso de fertilización *In Vitro* la cantidad de embriones obtenidos después de este procedimiento.
- Determinar la calidad de embriones bovinos que se obtienen al día sexto después de la introducción en el oviducto ovino.
- Evaluar la relación que pueda tener la calidad de los embriones obtenidos con respecto a la calidad de los oocitos utilizados al inicio de la experimentación.
- Reconocer la importancia del oviducto en la reproducción asistida y las ventajas que ofrece el uso de un medio natural, sin la intervención de medios artificiales para la maduración de embriones bovinos.



## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. EL OVIDUCTO

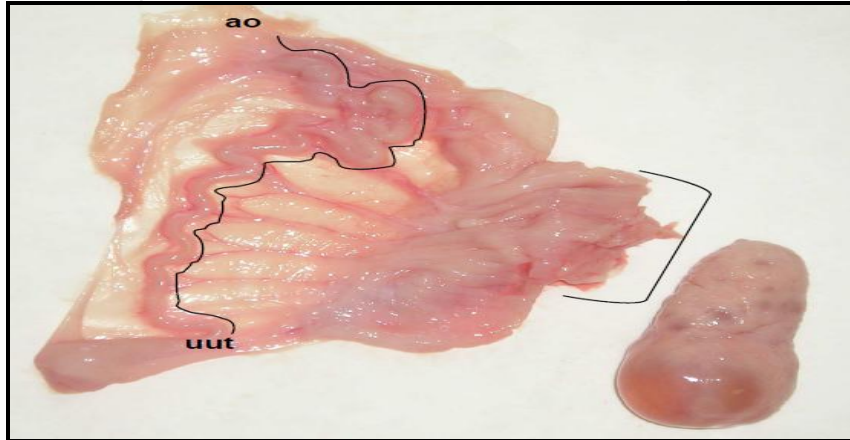
El oviducto o trompas uterinas de los ruminantes son estructuras largas de aproximadamente entre 20 a 25 cm, se sitúan sobre un saco formado por un pliegue del extremo libre del ligamento ancho, que envuelve al ovario (Figura 1). Anatómicamente el oviducto presenta cuatro regiones conocidas como: fimbria, infundíbulo, ámpula e istmo (Sisson, 1982).

La fimbria tiene forma de embudo y consta de prolongaciones digitiformes adyacentes al ovario que permiten la captación del óvulo (Figura 2). Esta porción también brinda una comunicación con la cavidad peritoneal. El infundíbulo es la continuación tubular de la fimbria y constituye el tercio distal del órgano. Este componente del oviducto tiene como finalidad el transporte de los gametos e histológicamente no puede distinguirse del ámpula. El ámpula es la porción media del oviducto, se extiende desde la unión istmo - ampular hasta el infundíbulo, en ella ocurre la fecundación, en particular en la unión istmo ampular.

Se ha postulado que la región del ámpula tenga un mayor grado de secreción en relación con el istmo debido a que presenta un mayor número de pliegues y mayor superficie epitelial lo que favorece los procesos de extravasación de sustancias a partir del plasma sanguíneo. El endosalpinx o epitelio de revestimiento del ámpula es altamente plegado por lo que prácticamente ocluye la luz del órgano (Anzaldúa, Arce, Cerbón, y Camacho, 2003).

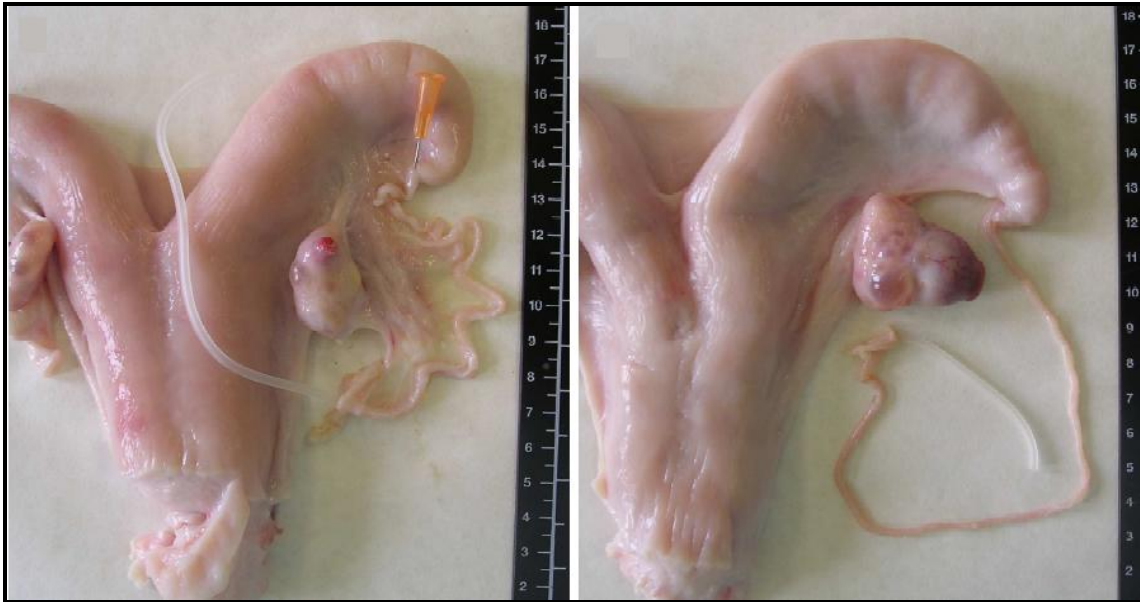
El istmo forma el tercio proximal del oviducto y está adyacente al útero, el sitio de unión con el útero se llama unión útero tubárica, en la que se incluye una porción intramural llamada región intersticial. Histológicamente el istmo se caracteriza por un mayor grosor del órgano, debido particularmente a que la porción muscular presenta un mayor número de capas; la mucosa presenta pocos pliegues y el epitelio cumple funciones secretoras predominantemente. La unión istmo - ampular actúa como un esfínter funcional, que controla el transporte del óvulo hacia el útero, en el istmo también ocurre la capacitación de los espermatozoides (Anzaldúa et al., 2003).

Figura 1. Imagen de un ovario bovino con su respectivo oviducto sin disectar rodeado por su mesosalpinx. Se ha marcado el trayecto oviductal con una línea paralela, marcando con (uut) la unión útero ovárica hasta (ao) ampolla oviductal, el corchete señala el punto de unión del íleo ovárico al mesosalpinx.



Tomado de: Carrasco (2007).

Figura 2. Tracto reproductivo bovino. El oviducto aparece canulado, la aguja señala la unión útero ovárica.



Tomado de: Carrasco (2007).

## 1.2. DESARROLLO EMBRIONARIO

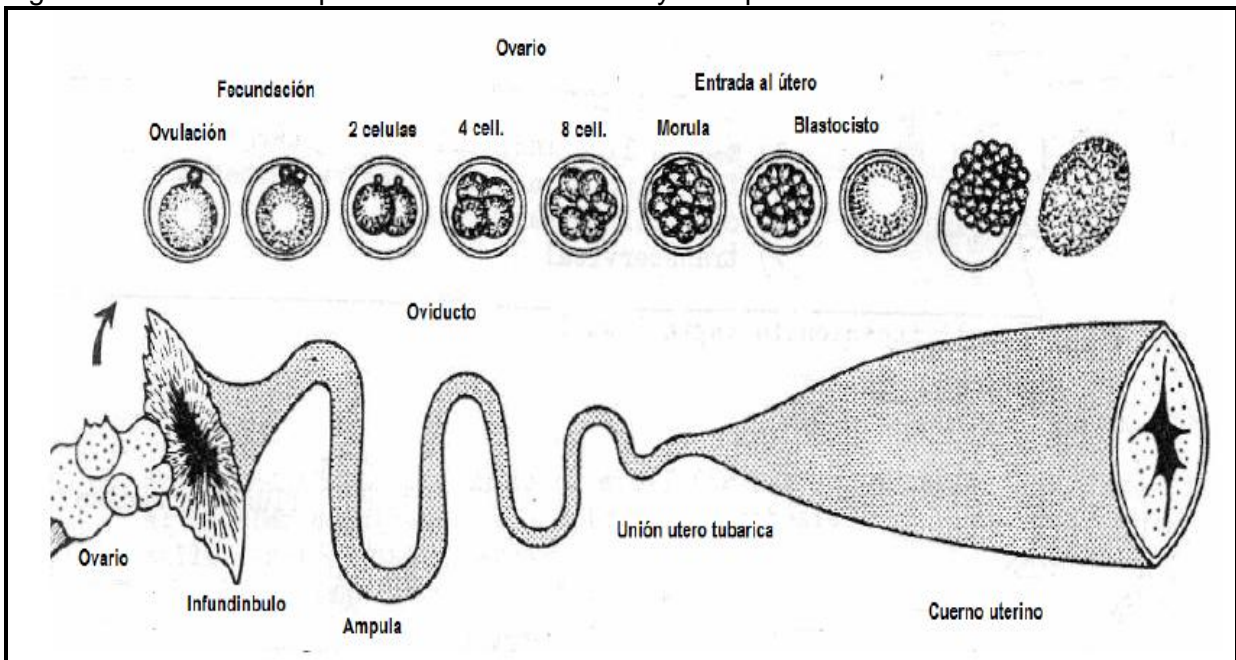
Los factores que comprometen el desarrollo embrionario y el subsiguiente crecimiento fetal son complejos ya que involucra procesos como la proliferación celular, el desarrollo y

mantenimiento del cuerpo lúteo, las funciones del oviducto y del útero, la implantación y vascularización del embrión entre otros (Tovío, Duica y Grajales, 2008).

Cuando es liberado el oocito empieza su camino por el oviducto, primero es atrapado por las fimbrias quienes se encargan de dirigirlo al interior del oviducto por medio de la actividad ciliar, en ese momento el oocito mide alrededor de 150 a 190 micrómetros de diámetro (Figura 3). En la ampolla del oviducto la fecundación desencadena el desarrollo del embrión, pocas horas después de la fusión de las dos células, ovulo y espermatozoide, el cigoto resultante empieza a dividirse en nuevas células denominadas blastómeros, toda estas divisiones hasta el día 8 ocurren dentro de la zona pelúcida (Palma, 2008).

Los diferentes acontecimientos involucrados en el desarrollo del embrión se empiezan a contar desde el día del estro, el día 1 corresponde al día de la ovulación, así normalmente después de la fecundación, el día 2 el cigoto de una célula se divide en 2 células, el día 3 se observan 4 células, hasta el día 4 cuando el cigoto posee 8 células este es transportado a través del oviducto ya que al día 5 aproximadamente se produce el ingreso al cuerno uterino con un estadio de 16 células, el embrión continúa con su desarrollo y al día 5 es denominado mórula y se encuentra con 32 blastómeros (Figura 4) (Palma, 2008).

Figura 3. Desarrollo temprano del embrión bovino y transporte en el oviducto.

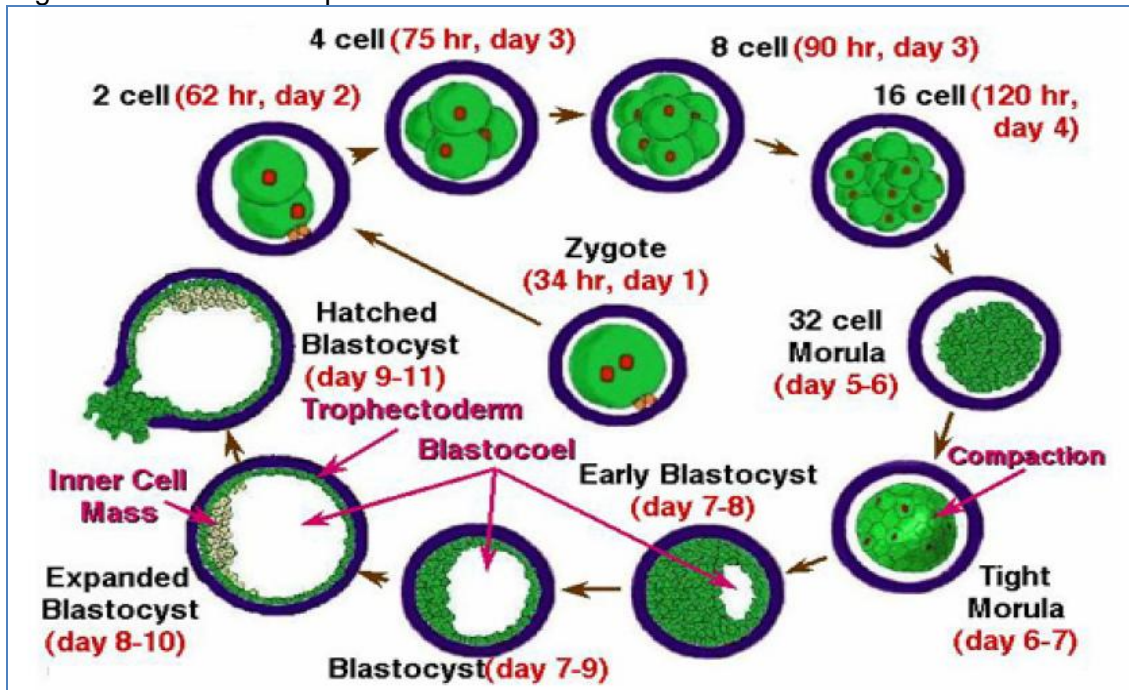


Tomado de: Mellisho y Gallego (2006).

Después entre el día 5 y 6 se nos presenta el estadio de mórula compacta con 32 a 64 blastómeros aproximadamente, seguido al día 7 por el estadio de blastocito temprano el cual posee de 100 a 200 células y se caracteriza por el comienzo de transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad llamada blastocelo en el interior del embrión, el estadio de blastocito se encuentra entre los días 7 y 8 en el cual es característica la marcada diferenciación entre las células del trofoblasto. El blastocito expandido entre el día 7 y 8, posee más de 200 células, su diámetro aumenta

considerablemente y empieza un adelgazamiento de la zona pelucida a 1/3 de su espesor original, es en este momento donde la presión creciente de los blastómeros producen la ruptura de la zona pelucida y comienza la protrusión de las células, este estadio se conoce como blastocito protruido lo cual sucede entre el día 8 y 9 con una cantidad considerable de células, entre 200 a 800 células (Figura 5) (Palma, 2008).

Figura 4. Desarrollo temprano del embrión bovino.

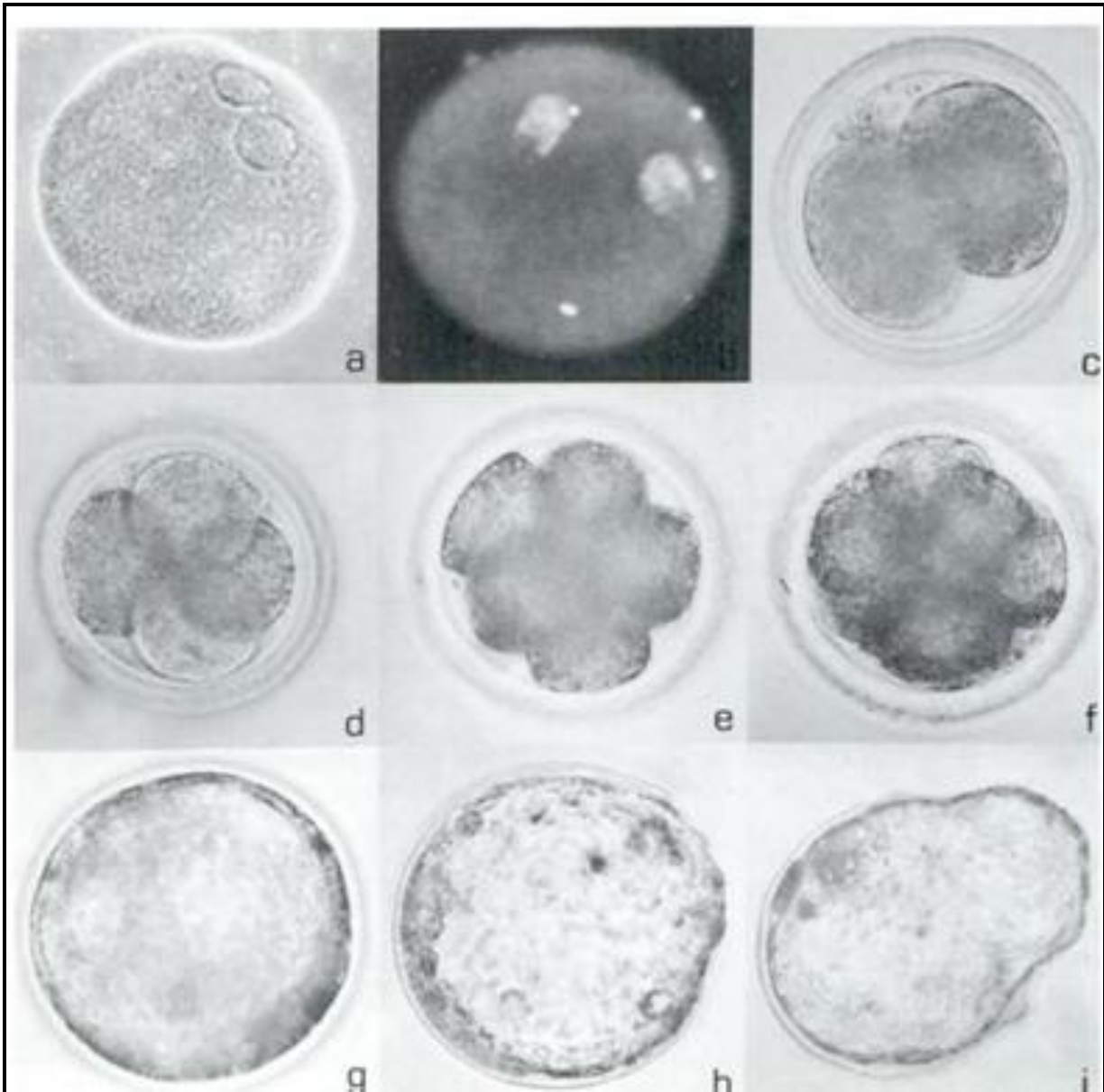


Tomado de: Mellisho et al. (2006).

Durante los primeros estadios de división celular desde una célula hasta el blastocisto temprano alrededor del día 7 - 8, el embrión se encuentra encerrado en la zona pelucida, donde sus requerimientos para mantenimiento se basan en el piruvato y oxalacetato. En estas primeras etapas antes de la fertilización, se ha evidenciado la presencia de factores de crecimiento (FC) como el transformador alfa ( $TGF-\infty$ ), el transformador beta ( $TGF-\beta$ ) y el derivado de plaquetas (PDGF), lo cual sugiere que están involucrados en el proceso de desarrollo temprano del oocito (Tovío et al., 2008).



Figura 5. Estado de desarrollo preimplantacional in vitro en bovino, a,b) cigoto de 18-20 horas de cultivo, c) conceptus con dos células 48 horas de cultivo, d) conceptus con cuatro células 48 horas de cultivo, e) Mórula de 6 células 72 horas de cultivo, f) Mórula de 8 células 72 horas de cultivo, g) blastocisto 7 días de cultivo, h) blastocisto empezando a eclosionar de la zona pelucida 9 días de cultivo, i) blastocisto en avanzado estado de eclosión de la zona pelucida 9 días de cultivo.



Tomado de: Archivos de medicina veterinaria, Vol. 28: No.1 (1996)

Los Factores de crecimiento son polipéptidos de peso molecular más o menos de 30.000 Kd, producidos por diversos tipos de células, que actúan localmente dentro del mismo tejido en forma autocrina o paracrina, no se almacenan intracelularmente y su liberación depende de la "síntesis de novo". Su efecto biológico es ejercido por la interacción con los receptores de membrana, que usualmente son glicoproteínas. La respuesta a los factores de crecimiento es una estimulación rápida al transporte de aminoácidos, utilización y consumo de glucosa, ARN y síntesis de proteínas, algunos inducen síntesis de ADN y replicación celular (Peña, Góngora y Estrada, 2007).

Los factores de crecimiento (FC) se clasifican con base en su estructura y actividad biológica dentro de familias: Familia del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), compuesta por EGF, amfíregulina, EGF-ligador de la heparina y TGF- $\beta$ . Otros factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Insulínico 1 y 2 (IGF-I, IGF-II). El estudio de los FC es difícil ya que pertenecen a un complejo sistema que permite que algunos sirvan como sus propios receptores (Peña et al., 2007).

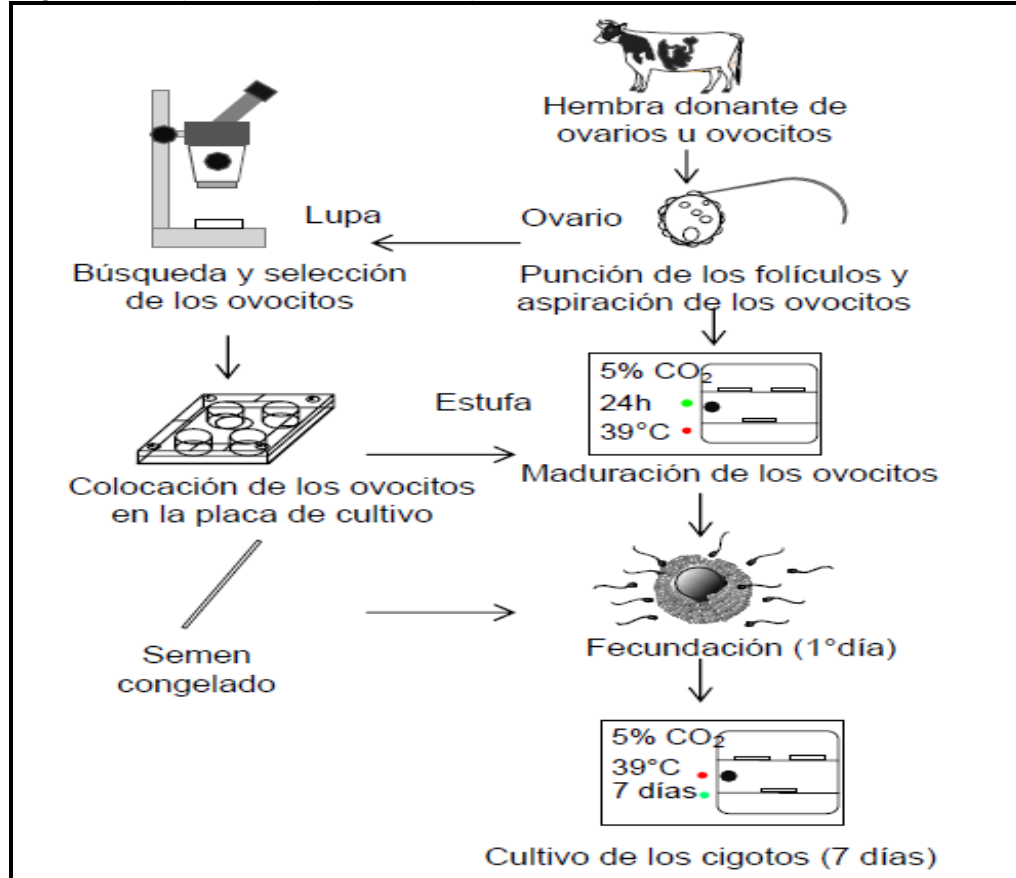
Existe evidencia que los factores de crecimiento se expresan antes de la implantación, en oocitos de ratón y bovino, los factores de TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  y PDGF se expresaron antes de la fertilización. El efecto estimulador de los FC sobre el desarrollo embrionario fue reconocido cuando fueron adicionados *in vitro*, lo que sugiere la existencia de un mecanismo autocrino para estas moléculas.

En el oviducto del bovino, se han identificado ARNm para TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF y bFGF, mientras que el PDGF y las subunidades de inhibina- $\alpha$  y  $\beta$  sólo fueron localizadas en ciertas regiones específicas del oviducto. Los estados tempranos de preimplantación embrionaria *in vivo*, pueden ser regulados por los FC tanto de origen materno como embrionario. Algunos como la insulina y el IGF-I pueden operar a través del metabolismo intermediario. El ARNm de IGF-I se ha encontrado en el oviducto bovino durante el descenso del embrión al útero (Peña et al., 2007).

### 1.3. CULTIVO EMBRIONARIO IN VITRO

El proceso para el cultivo de embriones *in vitro* posee una serie de pasos como son la obtención y maduración de los oocitos, la fertilización de los mismos y finalmente la maduración de los embriones como se muestra en la Figura 6. Los sistemas de maduración *in vitro* deben asegurar que el oocito resultante complete normalmente su desarrollo y sea capaz de ser fecundado dando origen a un cigoto competente que logre continuar su desarrollo luego de la transferencia. Leibfried, Crttser, Parrish y First (1989) lo resumen a tres aspectos principales: maduración nuclear, capacidad de ser fecundados y capacidad de continuar su desarrollo.

Figura 6. Esquema del proceso de producción in vitro de embriones.



Tomado de: Palma (2008).

### 1.3.1. Materiales de planta de sacrificio

La súper ovulación de animales es un buen método para la obtención de oocitos viables pero a su vez tiene un alto costo, sobre todo para programas de investigación, debido a esto el material de plantas de sacrificio bovinos es una fuente económica y fácil de obtener oocitos viables (Figura 7). En la producción de embriones con ovarios de planta de sacrificio fue necesario desarrollar métodos que permitieran la recolección de varios oocitos por ovario respetando las temperaturas y tiempos adecuados (Gordon, 2004).

El transporte de los ovarios se puede hacer en solución fisiológica o PBS con antibiótico a temperatura ambiente. Los primeros investigadores en el tema observaron que los ovarios transportados a 24 - 25 °C durante 11 horas no disminuía la calidad de los oocitos, al contrario temperaturas superiores a 30 °C por más de 2 horas de transporte disminuyen notablemente la calidad de los oocitos, otros autores reportaron que ovarios refrigerados durante 12-24 horas a 4 °C no afectó la tasa de división (Palma, 2008).

Figura 7. Ovarios procedentes de planta de sacrificio bovina.



### 1.3.2. Aspiración folicular

Después de estar los oocitos en el laboratorio se procede a lavarlos 3 veces en medio de transporte, siguiendo con la obtención de los oocitos por medio de un aparato de punción, que opera con una presión negativa de 100 mmHg. En caso de no contar con un aparato de estas características es posible también aspirar los oocitos con una jeringa de 5 ml con la cual se genera un vacío adecuado (Figura 8).

Se puncionan todos los folículos terciarios visibles que posean un tamaño comprendido entre 2-6 mm, luego, el líquido folicular con los oocitos se deja sedimentar aproximadamente 15 minutos antes de aislar los complejos cumulus-oocito. Seguidamente de lavarlos 2 veces es posible clasificar a los oocitos morfológicamente en 3 categorías. Se destinan a la maduración aquellos oocitos que posean un *cumulus oophorus* denso que cubra la totalidad del oocito y un citoplasma uniformemente granulado y oscuro (SÜSS, 1987).

Figura 8. Aspiración folicular con jeringa en laboratorio





Los oocitos se obtienen generalmente de folículos antrales mayores a 2 mm y menores a 6-7 mm de diámetro ya que oocitos de folículos más pequeños carecerían de competencia meiótica en cultivo, serían incapaces de completar la maduración nuclear. Ya que la capacidad para madurar de los oocitos está restringida al final del período de crecimiento, los oocitos en etapas muy tempranas son incapaces de experimentar la ruptura de la vesícula germinativa después de su aislamiento de las células de la granulosa. Por otra parte, oocitos de folículos más grandes a menudo se encuentran en procesos de atresia, probablemente por esto los mayores porcentajes de fecundación y desarrollo se obtengan con oocitos de folículos entre 2-7 mm (Pavlok, Lucas-Hanhn y Nienian, 1992).

### **1.3.3. Maduración de los oocitos**

Las condiciones de cultivo durante la maduración *in vitro* juegan un papel crucial en las tasas de fecundación y en la capacidad de desarrollo posterior de los embriones. Tradicionalmente se han usado para madurar oocitos bovinos, medios complejos tamponados y suplementados con albúmina, sueros y hormonas (FSH, LH y 17  $\beta$ -estradiol), sin embargo, los oocitos bovinos reinician la meiosis en una gran variedad de medios que van desde una solución salina simple hasta medios más complejos; sin embargo, se prefiere estos últimos ya que se ha comprobado que el medio utilizado afecta no solamente la capacidad posterior de fecundación, sino que también el desarrollo embrionario (Leibfried et al., 1989).

El sistema de maduración empleado en muchos laboratorios implica el uso de TCM-199 a 38.5°C suplementado con 10% de suero fetal bovino y gonadotrofinas más un 5% de dióxido de carbono en el aire, tras la incubación durante 24 horas el oocito completa su maduración, elimina el primer corpúsculo polar y está preparado para su fecundación.

Se ha examinado la acción de diferentes compuestos en la maduración de los oocitos mostrando muchos de ellos efectos positivos. La LH producida por la adenohipófisis es esencial para la maduración meiótica del ovulo, la acción de la LH sobre sus células diana es mediada por la acción de receptores específicos de la membrana celular y aunque no hay receptores para LH en la superficie del oocito si las hay en las células del mismo y se ha comprobado que es uno de los responsables de la meiosis en oocito tanto *in vivo* como *in vitro* (Gordon, 2004).

La duración óptima del tiempo de maduración ha sido también sujeto de estudio; normalmente se ha estandarizado a un período de 22-26 horas debido a que en ese lapso se lograría completar satisfactoriamente la maduración hasta metafase dos (Pavlok et al., 1992).

### **1.3.4. Fertilización *in vitro* (FIV)**

Otro paso crucial para producir un embrión exitoso es la fertilización del mismo que en el caso *in vitro* ocurre fuera del organismo materno. La fertilización comprende una serie de procesos cuyo punto final está representado por la fusión de los núcleos de ambos gametos y la formación del genoma del nuevo individuo.

El medio de fecundación es un medio Tirodes-Lactato modificado, al que se le agregan heparina (30  $\mu$ l de la solución final), adrenalina e hipotaurina, 15  $\mu$ l de la solución final. El tiempo de fecundación es de 20-24h bajo las mismas condiciones de cultivo que durante la maduración de los oocitos.

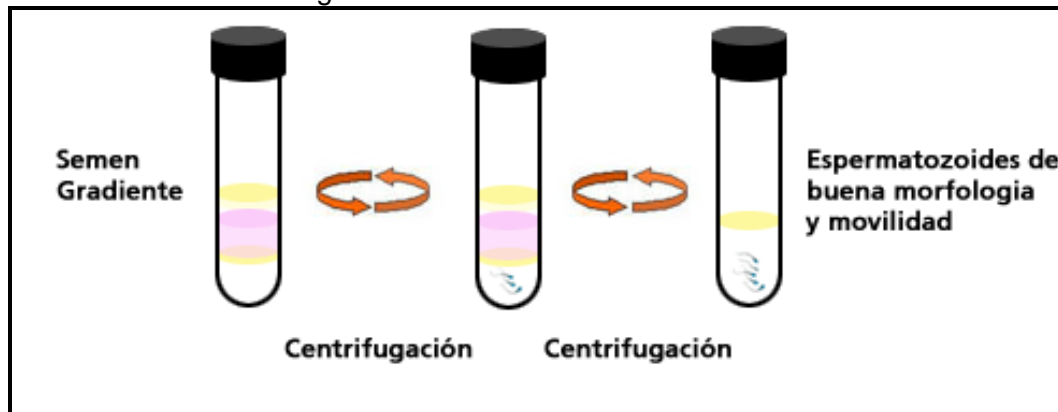
La penetración del espermatozoide desencadena la segunda parte de la división meiótica con la expulsión del segundo cuerpo polar. Simultáneamente se cumple la descondensación de la cabeza espermática y la formación del pronúcleo masculino. Este proceso es dependiente de la presencia de factores de crecimiento del pronúcleo masculino en el citoplasma del oocito. Para la síntesis de esos factores de crecimiento es necesaria la presencia de esteroides y catecolaminas durante la maduración del oocito (Palma, 2008).

### 1.3.5. Preparación del espermatozoide

Deben darse ciertos aspectos preliminares antes que los espermatozoides se encuentren en disposición de llevar a cabo la fecundación. En la producción de embriones uno de los primeros pasos consiste en la selección de espermatozoides para su uso en la FIV. Una práctica común consiste en seleccionar espermatozoides basándose en un medio de separación Percoll (Figura 9). Se ha demostrado que los espermatozoides con mayor viabilidad e integridad del acrosoma podrían obtenerse mejor con la separación Percoll que con un método de nadado hacia arriba o Swin up.

La Centrifugación por gradiente de Percoll permite separar espermatozoides por centrifugación a través de gradientes de partículas de sílice coloidal cubiertas con polivinilpirrolidona. El semen se coloca sobre este gradiente de Percoll y se centrifuga 300g durante 20 minutos. Este método aísla eficazmente espermatozoides móviles libres de otros constituyentes, estos se acumulan en el gradiente en su densidad apropiada. La muestra espermática ya preparada se conserva en tubo cerrado a temperatura ambiente hasta ser utilizada (Gordon, 2004).

Figura 9. Esquema que representa los pasos para la preparación del semen por medio de la técnica de gradiente Percoll.



Tomado de: Brugo (2010).

### 1.3.5. Maduración embrionaria

El último paso es la maduración del embrión para la cual se han desarrollado y aplicado varios protocolos, los cuales incluyen diferentes sistemas de cultivo: In Vitro como son el SOF-cultivo el cual utiliza fluido sintético de oviducto, el CO-cultivo que se realiza en presencia de células

epiteliales del oviducto; y cultivo In Vivo en el cual se utilizan hembras sincronizadas. El cultivo in Vitro SOF-cultivo se basa en el análisis bioquímico del fluido de oviducto ovino, más el agregado de albumina sérica bovina (BSA), el cual se ha utilizado para cultivar embriones ovinos, bovinos y caprinos, para este se toman 500µl de SOF con 3mg/ml de BSA que corresponden al medio de cultivo, los cigotos se mantiene allí durante 7 días a 38.5°C en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire (Rodriguez et al. 2007).

Otra manera de alcanzar el desarrollo embrionario es por medio del CO-cultivo para el cual es muy importante realizar una buena preparación de las células del epitelio del oviducto que se va a utilizar. Se deben colectar los oviductos necesarios, estos se separan del tejido adyacente y su mucosa es retirada mecánicamente ejerciendo presión sobre el oviducto desplazándose hacia el extremo ovárico de manera que forzosamente salgan las células de la mucosa, los fragmentos epiteliales resultantes son lavados 3 veces en medio TCM199, posteriormente son distribuidos en los frascos de cultivo requeridos con 500µL de TCM199 suplementados con 10% de suero fetal bovino, suero fetal caprino o 20% de suero humano, además de 80µg/ml de gentamicina, todo manejado a una temperatura de 38.5°C o 39°C en una atmosfera con 5% de CO<sub>2</sub> (Enright et al. 2000).

Este medio debe ser estabilizado aproximadamente por 2 días antes de introducir los embriones y se cambia 24 horas antes de introducir los embriones en el TCM199 por SOF con 3mg/ml de albúmina sérica bovina suplementado con 10% de suero fetal bovino, suero fetal caprino o 20% de suero humano. De la misma manera debe renovarse el medio cada 48 horas mientras dure el cultivo (Rodriguez et al. 2007).

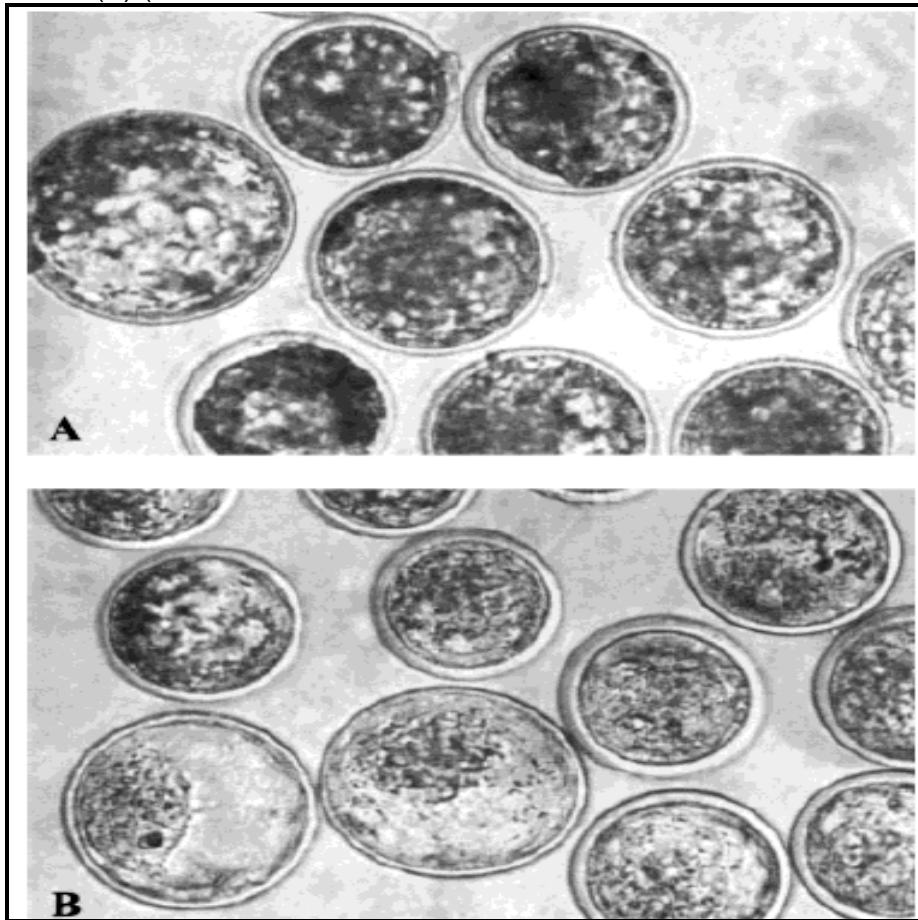
#### **1.4. CULTIVO DE EMBRIONES IN VIVO VS IN VITRO**

En la actualidad hay numerosos métodos para la producción de embriones, la mayoría realizados por medio de procesos de laboratorio, con lo cual se producen gran número de embriones y de manera más practica si se compara con los procesos de producción in vivo, más aun cuando se utilizan receptoras intermediarias, pero se obtienen embriones de menor calidad comparándolo con los resultados in vivo.

Se tiene conocimiento que los embriones producidos in vivo tienen mayor calidad que los producidos in vitro resultando esto en una limitación comercial, sobre todo en los rangos de crío supervivencia debido a que los embriones producidos en laboratorio tienen mayor cantidad de gotas de lípidos intracelulares lo cual causa degeneración del embrión pos congelación a esto se le puede sumar la gran posibilidad de sufrir apoptosis. El cultivo de embriones en oviductos de hembras recipientes como es el caso de ovejas ha arrojado grandes resultados por lo que esta técnica a tomado fuerzas para producir embriones de altísima calidad (Figura 10), sin embargo la técnica quirúrgica que se realiza para el trasplante trae complicaciones y se requiere la facilidad de un laboratorio (Wetscher, 2005).

El 40 a 50% de embriones procedentes de animales domésticos madurados in vitro y fertilizados in vitro no alcanzan el estado de blastocisto. A pesar de esto, el 80% de los oocitos normalmente fertilizados alcanza un estado de clivaje de 2 células donde suele parar su división, con esto se podría pensar que el periodo post fertilización es el culpable del rendimiento del embrión en cuanto a calidad, pero de hecho ha sido demostrado que aunque este periodo es el más largo y es muy importante en la producción de embriones in vitro no es el más importante. La baja calidad de blastocistos in vitro frente a los in vivo se evidencia en su morfología, metabolismo y la expresión de los genes, y esto se evidencia principalmente en los porcentajes de supervivencia (Rizos, Duffy, Boland y Lonergan, 2002).

Figura 10. Comparación morfológica de blastocistos totalmente producidos in vitro (A) (los cuales tienen un color muy oscuro, no se detalla de forma clara sus blastómeros además de no tener una forma totalmente esferoide) y blastocistos IVM/IVF incubados en oviductos ovinos (B) (No existen defectos visibles).



Tomado de: Rizos, Duffy, Boland y Lonergan (2002).

En un experimento realizado por Rizos, Fair y Papadopolus (2002), en el cual embriones bovinos producidos in vitro e in vivo y embriones ovinos producidos in vitro e in vivo fueron vitrificados para después medir el grado de supervivencia, se observaron que los embriones de las dos especies producidos in vivo tuvieron mayor supervivencia que los in vitro. Sin embargo una significativa proporción de los embriones ovinos IVP sobrevivió, comparada frente a sus equivalentes bovinos durante todos los momentos de la evaluación. Los embriones bovinos producidos in vivo tuvieron un supervivencia mucho mas alta que los producidos in vitro 85.7% vs 18.1% a las 72 horas.

La supervivencia de los embriones ovinos producidos in vivo fue mas alta que la de los embriones ovinos producidos in vitro, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Además los embriones ovino producidos in vitro sobrevivieron mas que los embriones bovinos producidos in vitro (47% vs 18.1% a las 72 horas para ovinos y bovinos respectivamente).

Enright, (2000) encontró que, mientras que el cultivo en el oviducto no afectó a la proporción de embriones que se consideran de calidad congelable, el porcentaje de embriones que

sobreviven después de descongelar es mayor para embriones madurados en el oviducto frente a los cultivados en SOF, aun mas al aumentar el tiempo de congelación, obteniendo 63 % de supervivencia 72 horas post congelación con cultivo *in vivo* frente a 0% de supervivencia en el cultivo *in vitro* como se muestra en la Tabla 1 .

Tabla 1. Efecto del sistema de incubación en el grado de criosupervivencia en diferentes momentos.

Tratamiento	Congelados	24h	48h	72h
<b>Incubados In vivo</b>	48	75	69	63
<b>Incubados In vitro</b>	116	11	0	0

Adaptado de: Enright (2000)

Se presentan diferencias en la expresión genética debido al método de maduración ya sea este *in vitro* o *in vivo* que pueden explicar las diferencias en la calidad observada pos descongelación. Wrenzycki et al. Demostraron que la expresión del gen 43 COMeXbl en la fase de blastocito difiere entre los embriones de bovino producidos *in vitro* e *in vivo*, este gen está implicado en la formación de una proteína que le da lugar a uniones entre las células. Las uniones pobres se asocian con la formación de células con poca compactación y lo que es común en los embriones producidos *in vitro*.

Además, el desarrollo acelerado en los procesos *in vitro* pueden afectar la regulación génica y la transcripción, dando lugar así anomalías, como el gran tamaño fetal en la especie bovina. También se ha demostrado que las condiciones de cultivo pueden causar una expresión temprana de los genes en el embrión. El mismo autor demostró que los niveles de ARNm de los genes indicativos de varias funciones fisiológicas durante el desarrollo temprano previo a la implantación de la especie bovina se ven afectados por condiciones del cultivo.

Otros estudios realizados por Pontes et al. (2009), donde 2200 oocitos de animales de raza Nelore fueron llevados a estadios transferibles por métodos *in vitro* e *in vivo* y luego comparados en relación a calidad en su desarrollo y capacidad de generar una preñez exitosa, de este total de embriones, 910 embriones fueron sometidos a procedimientos de fecundación *in vitro* es decir el 41,4 %. Los embriones que tuvieron desarrollo *in vivo* fueron logrados por medio de superovulación de las donantes y posterior inseminación con lo cual se obtuvieron 376 embriones, de los cuales 289 fueron viables como lo muestra la Tabla 2.

Las tasas de preñez fueron diferentes entre los embriones producidos *in vivo* y los producidos *in vitro*, en el día 30 después de la transferencia de embriones se obtuvo un porcentaje de preñes de 45,6 % *in vivo* vs 37,4% *in vitro*, en el día 60 se reporto 41,5 % *in vivo* vs 33,5% para los producidos *in vitro*. Para estos sistemas, las pérdidas embrionarias entre los días 30 y 60 fueron 9 % y 10,5% para *in vivo* e *in vitro* respectivamente, por lo cual se concluyo que la calidad de embriones que se produjeron *in vivo* frente a los producidos *in vitro* influyo significativamente en porcentajes exitosos de preñes. Todos los embriones fueron transferidos en fresco (Pontes et al., 2009).

Tabla 2. Porcentajes de preñes al día 30, 60 y pérdidas embrionarias obtenidos por métodos in vitro e in vivo.

Método	No. Embriones transferidos	No. Preñes al día 30	No. Preñes al día 60	No. Pérdidas embrionarias
	910	341(37.4 %)	305(33.52%)	36(10.5%)
	289	132(45.6%)	120(41.52%)	12(9%)

Adaptado de: Pontes et al. (2009).

Wetscher y Havlicek (2005) realizaron un estudio donde combinaron técnicas de maduración embrionaria, es decir, transfirieron embriones bovinos en varios estados de desarrollo a oviductos bovinos y fueron recuperados al día 7 por medio de lavado de oviductos y cuernos uterinos, y el estudio consistía en evaluar el desarrollo y pre implantación. El objetivo de este estudio fue aplicar la endoscopia para el cultivo in vivo y pre implantación de embriones bovinos estudiando la fisiología de la migración a través del oviducto y la morfología de los embriones transferidos.

Tabla 2. Desarrollo de gametos bovinos de 4 y 8 células madurados y fertilizados in vitro y luego incubados in vivo en oviductos bovinos frente a gametos producidos in vitro totalmente.

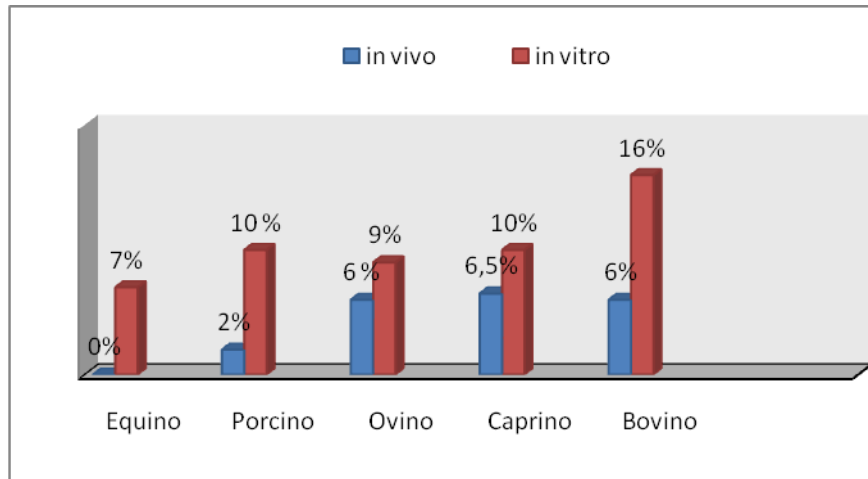
	Incubados In vivo	Incubados In vitro
<b>Embriones transferidos</b>	682	----
<b>Embriones recuperados</b>	545 (79.9%)	1074 (100%)
<b>Blastocitos día 7</b>	294 (41.9%)	277 (20.9%)
<b>Blastocitos día 8</b>	304 (43.3%)	499 (37.7%)

Adaptado de: Wetscher y Havlicek (2005)

Los resultados mostrados en la Tabla 3 muestran como el oviducto favorece el desarrollo de embriones IVM/FIV, se demostró que la tasa de recuperación fue muy buena, el 79.9 %, lo cual es un punto crucial para confirmar las funciones del oviducto como un complejo muscular, ciliar y de secreciones que interactúan con el gameto. Estos resultados fueron muy parecidos a los reportados en estudios donde se realizo el mismo proceso con la diferencia de que los oviductos de ovejas estaban ligados en pro de facilitar la recuperación embrionaria.

Los mejores resultados se obtuvieron con el cultivo in vitro de embriones de 4 a 8 células que fueron transferidos, con un 41.9% de blastocitos en estadio de día 7 y 43.3% en estadio de día 8, lo que demuestra que la combinación de los factores in vitro y in vivo fueron mucho más favorables que los embriones producidos totalmente in vitro (Wetscher y Havlicek, 2005). Otro estudio detallo la incidencia de la presentación de apoptosis en los dos tipos de cultivo, in vivo e in vitro (Figura 11), esto en busca de dar una respuesta a los bajos índices de preñes después de los trasplantes con embriones producidos in vitro, se utilizaron diferentes mecanismos para detectar los indicios de apoptosis en las células, encontrando que el porcentaje de daño celular por blastocito fue menor en los embriones producidos in vivo que in vitro en todas las especie que se estudiaron (Pomar, 2005).

Figura 11. Porcentaje de presentación de apoptosis en embriones de equinos, porcinos, ovinos, caprinos y bovinos cultivados in vitro e in vivo



Tomado de: Pomar (2005)

Diferentes autores han estudiado la tasa de recuperación de embriones transferidos en el oviducto ovino encontrando valores alrededor del 50% a 70% (Rizos et al, 2002). Robl y Prather (1987) reportaron un porcentaje de recuperación del 61% en oviductos ovinos (Tabla 4).

Tabla 3. Recuperación de embriones bovinos después de 5 días en el oviducto ovino.

	Trasferidos	Recuperados
<b>Embriones</b>	49	30(61%)

Adaptado de: Robl y Prather (1987).

### 1.5. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE OOCITOS

Los oocitos inmaduros de los mamíferos se encuentran en el interior del folículo ovárico rodeados de una masa de células somáticas y mantenidos en un estado de reposo meiótico (dictiatio); este estado se evidencia por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal.

Este estado de reposo se mantiene hasta que llega la oleada preovulatoria de gonadotropinas que provocará el inicio de la maduración nuclear del oocito mientras que el cúmulo celular que le rodea se mucifica y se expande. De esta manera, en el momento de la ovulación, el oocito está rodeado de un cúmulo expandido a la vez que nuclearmente ha progresado hasta llegar a

la metafase de la segunda división meiótica, hecho evidenciado por la extrusión del primer corpúsculo polar al espacio perivitelino (Yanagimachi, 1988).

*In vivo*, el tamaño del oocito está correlacionado con la capacidad de desarrollo del folículo. Oocitos competentes para el desarrollo deben medir como mínimo 110  $\mu$ m de diámetro, cuanto mayor sea el tamaño folicular, mayor la capacidad del oocito de alcanzar el estado de ruptura de la vesícula germinal, la fecundación y posterior desarrollo.

De forma similar que con el tamaño del oocito, la morfología de los Complejos Cúmulus-Oocito (CCO) se estableció como criterio para seleccionar los más adecuados para ser cultivados, la evaluación morfológica se lleva a cabo en un lente a 40 aumentos y toma en cuenta el aspecto del cúmulus y del oocito como muestra la Tabla 5 (Palma y Brem, 2001).

Tabla 4. Criterios de selección de los CCOs inmaduros

<b>Cúmulus</b>	<b>Citoplasma oocito</b>
<b>Número de capas que lo forman</b>	Color
<b>Compactación</b>	Densidad
<b>Transparencia</b>	

Adaptado de: Palma y Brem (2001).

El primer método obvio para discriminar oocitos competentes e incompetentes es la morfología del cúmulo. Las células del cumulo son una sub-población de células de la granulosa con distinta funciones. Su función es proveer nutrientes a los oocitos durante su crecimiento, para participar en la formación de la zona, y seguir el pico de LH, para sintetizar los componentes de la matriz de proteínas y ácido hialurónico importante en el transporte oviductal.

Las células del cúmulo están compuestas por una corona radiada, que representa las capas mas cercanas al oocito y normalmente en contacto cercano usando extensiones citoplasmáticas a través de la zona pelucida, y el cúmulo exterior que comunica con la corona a través de uniones Gap (Sirard y Blondin, 1996).

La delgadez del cúmulo varía de acuerdo al tamaño folicular al igual que la integridad del cúmulo también variará con el status de salud de los folículos pero no necesariamente de una forma sincrónica. Durante la atresia, el cúmulo externo es menos compacto por que la aposición entre las células tanto en el interior del cúmulo con las capas exteriores es reducida. Algunos estudios han evaluado el impacto de la morfología del cúmulo en el subsecuente desarrollo. Cuando oocitos inmaduros fueron clasificados de acuerdo al número de capas de cúmulo que quedaban alrededor de oocitos después de la aspiración, entre más delgado el cúmulo, mejores posibilidades de desarrollo (Bols et al., 1996).

Un reducido número de capas puede ser la consecuencia de la aspiración de oocitos de folículos antrales tempranos o puede ser debido a la pérdida de capas externas causada por la atresia. Así un cúmulo delgado puede ser una característica asociada con el desarrollo de la competencia. El grupo de oocitos con mayor competencia poseen, un cúmulo menos compacto y originados de folículos saludables o ligeramente atresicos. Estos estudios fueron realizados con cultivos celulares individuales para permitir el establecimiento de la causa y efecto entre las características foliculares, la morfología del oocito y la competencia desarrollada.

La selección de los oocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro del oocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea como lo



muestra la Tabla 6 y la Tabla 7 (Palma y Brem, 2001). El diámetro de los oocitos condiciona su capacidad para madurar.

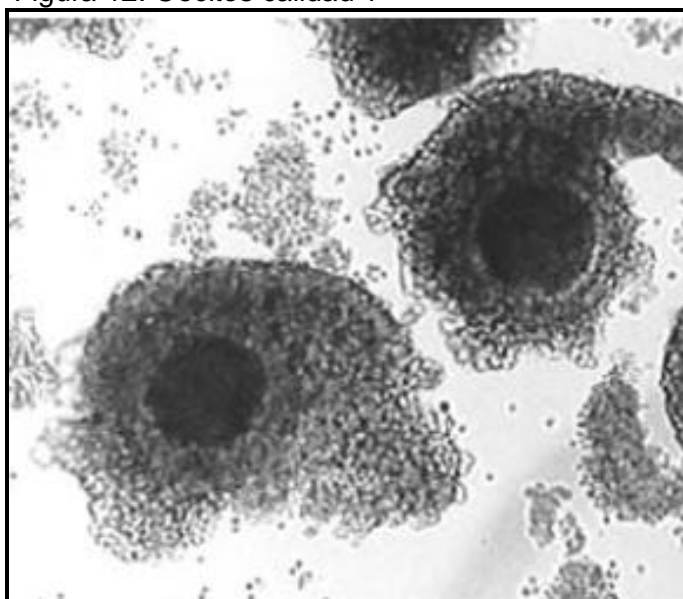
Tabla 5. Criterios de selección de los CCOs

Clasificación	Criterios
1	Cúmulus con capas múltiples
	Cúmulus compacto
	La totalidad del CCO es clara y transparente
	Citoplasma homogéneo
2	Cúmulus como 1 o algo más oscuro y menos transparente
	Ooplasma con granulación más densa y más oscura que en 1 en la periferia
3	Cúmulus menos compacto, más oscuro que en 1 o 2
	Con manchas oscuras
4	Cúmulus expandido

Adaptado de: Loos et al. (1989 y 1991).

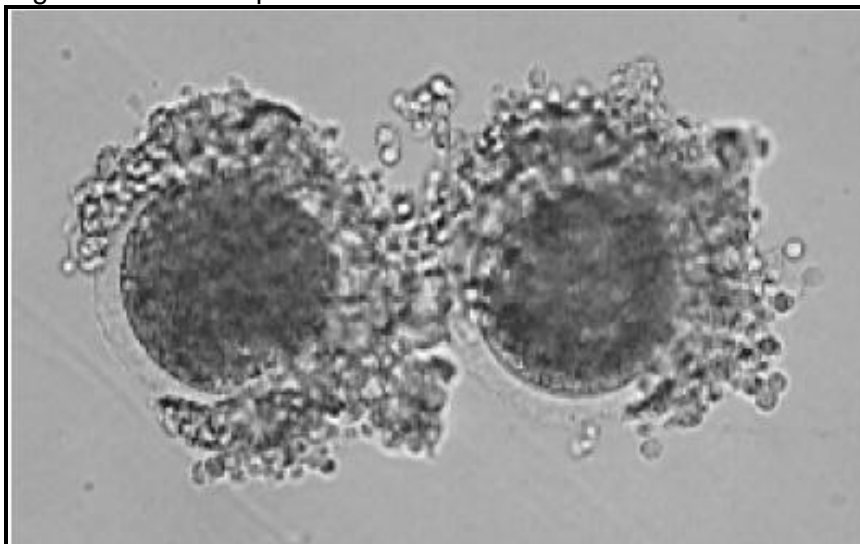
Los criterios propuestos y empleados en la actualidad son semejantes en la definición de los COOs óptimos para el cultivo, pero existen diferencia de grado en la evaluación. A fines prácticos se deberán cultivar solo los COOs que posean un cúmulus denso, con un mínimo de 5 capas que recubran la totalidad de la superficie del oocito, que su citoplasma sea de color gris oscuro uniforme y no contenga manchas (Figura 12 y Figura 13).

Figura 12. Oocitos calidad 1



Tomado de: Palma y Brem (2001).

Figura 13. Oocitos parcialmente desnudos



Tomado de: Palma y Brem (2001)

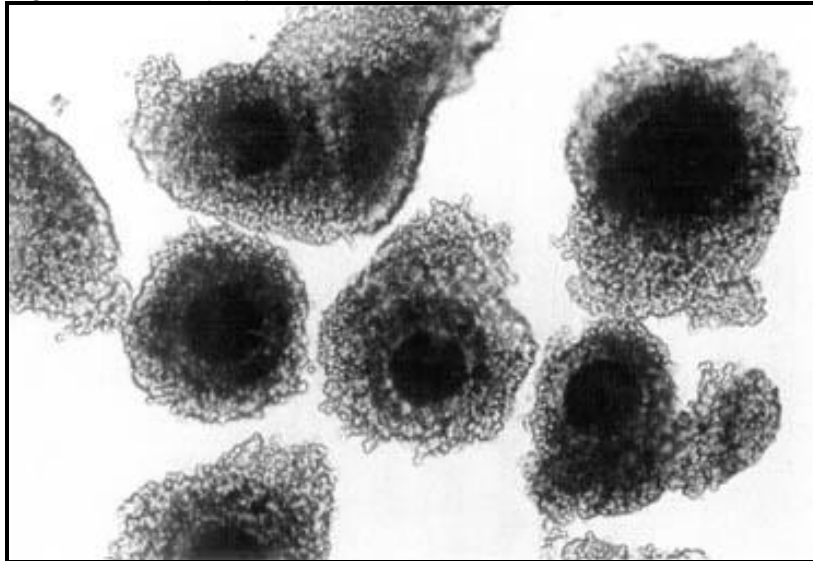
Tabla 6. Criterios de selección de los CCOs

Clasificación	Criterios
Buena	Cúmulus con capas múltiples, compacto pero translúcido
	Ooplasma con granulación fina, densa y uniforme
	Cúmulus ligeramente expandido, con menor número de capas que puede cubrir la zona pelucida, granulaciones ligeramente más gruesas.
Regular	Cúmulus parcialmente expandido y disperso
	Red de uniones son presencia de células de Cúmulus
	Oocitos pequeños o grandes, oocitos desnudos
Mala	Cúmulus muy oscuro (marrón oscuro, negro)
	Ooplasma de color muy claro o negro
	Ooplasma bueno con áreas muy claras o muy oscuras

Adaptado de: Hawk y Wall (1994)

Los oocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocistos, que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiada (Figura 14). Así, se ha comprobado que los oocitos que presentan un ooplasma oscuro muestran una acumulación de lípidos y un buen potencial para el desarrollo, mientras que los que presentan un citoplasma pálido tienen una baja densidad de orgánulos y escaso potencial de desarrollo. Por otra parte, cuando el ooplasma es negro, los oocitos están envejecidos y tienen un potencial para soportar el desarrollo muy bajo (Nagano, Takahashi y Katagiri, 2006).

Figura 14. Complejos Cumulo-ooocito de excelente calidad



Tomado de: Aller, Alberio y Palma (2000).

## 1.6. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES

La calidad embrionaria es un determinante importante para el éxito de los procedimientos de transferencia de embriones. Varios métodos se han reportado, pruebas de exclusión por coloración, las medidas de la actividad enzimática, captación de glucosa, y tinturas para diferenciar vivos y muertos, son útiles para predecir la supervivencia de los embriones después de la transferencia, pero los métodos requieren un equipo complejo y largo proceso en el período de cultivo in vitro, por lo tanto son de poco valor para la transferencia de embriones en condiciones de campo. Hasta la fecha, la evaluación morfológica ha sido ampliamente utilizada para evaluar la calidad del embrión y es útil para predecir las tasas de preñez para grupos de embriones bovinos después de la transferencia (Abe y Matsuzaki, 2002).

La evaluación de embriones sigue siendo uno de los métodos más subjetivos y cualitativos en la transferencia de embriones y la categorización de las normas varía entre los investigadores. Algunos de estos investigadores han descrito una evaluación efectiva de los embriones bovinos recuperados de vacas súper ovuladas. Se identificaron cuatro categorías basadas en características morfológicas, es decir, excelentes, buenas, regulares, y pobres.

Embriones con excelentes calidades y buenas calidades dan las mayores tasas de preñez, mientras que los embriones de pobre calidad arrojan resultados con menores tasas de éxito, lo que indica que la calidad del embrión puede ser un factor de predicción preciso de la tasa de preñez. Este método de evaluación consiste en la identificación de calidades del embrión en base a parámetros morfológicos tales como, la forma, el color, el tamaño del espacio perivitelino, el número de extrusión y células degeneradas, y el número y tamaño de las vesículas.

Varios factores, tales como la calidad de los oocitos, la tensión de oxígeno, la densidad de embriones, y el tipo de sustrato de energía durante la producción in vitro de embriones pueden afectar la tasa de preimplantación y el desarrollo del embrión. La calidad morfológica del oocito basado en la solidez y el número de capas de células cúmulo da efectos significativos

positivos sobre las tasas de maduración in vitro, la fertilización y el desarrollo de la mórula y de Ciclo del blastocisto, como se puede ver en la Tabla 8 (Khuranay Niemann, 2000).

Tabla 7. Efecto de la calidad morfológica del oocito inmaduro en las tasas de maduración In Vitro, fertilización, división y formación de mórula/blastocisto.

Categoría de los oocitos	Maduración		Fertilización		División	Mórula/blastocisto	
	Normal	Anormal	Normal	Anormal			
I	84.5 ± 4.5 <sup>a</sup> (84)	67.1 ± 6.5 <sup>a</sup> (79)	11.4 ± 1.4 <sup>a</sup>	61.4 ± 4.7 <sup>a</sup> (280)	33.9 ± 3.1 <sup>a</sup> (280)		
II	85.0 ± 2.4 <sup>a</sup> (140)	63.7 ± 7.1 <sup>a</sup> (124)	11.3 ± 3.8 <sup>a</sup>	52.0 ± 3.1 <sup>b</sup> (589)	13.8 ± 1.8 <sup>b</sup> (589)		
III	71.0 ± 4.5 <sup>b</sup> (51)	44.6 ± 3.9 <sup>b</sup> (56)	17.9 ± 2.9 <sup>a</sup>	26.0 ± 5.0 <sup>c</sup> (104)	0 (104)		
VI	32.7 ± 2.2 <sup>c</sup> (52)	16.3 ± 2.9 <sup>c</sup> (49)	12.2 ± 2.1 <sup>a</sup>	12.1 ± 2.8 <sup>d</sup> (99)	0 (99)		

Adaptado de: Khurana y Niemann (2000)

Los valores son porcentajes ± SEM agrupados a partir de 5 repeticiones. <sup>a</sup> vs <sup>b</sup> = P<0.005 en la misma fila. Las cifras entre paréntesis representan el número correspondiente de óvulos de cultivo.

La evaluación morfológica de un embrión considera los criterios mostrados en la Tabla 9 sobre las estructuras y cualidades:

Tabla 8. Criterios de evaluación morfológica de embriones

<b>ESTRUCTURA Y CUALIDADES</b>
Forma esferoide
Simetría de los blastómeros
Apariencia clara y neta de los blastómeros
Tonalidad oscura y uniforme
Unidad de la membrana celular
Proporcionalidad entre el embrión y el espacio peri vitelino
Integridad de la zona pelucida
Ausencia de vacuolas en el embrión y bridas celulares en el espacio perivitelino
Ausencia de detritus celulares adheridos a la zona pelucida
Compactación de los blastómeros

Adaptado de: Palma (2008).

Con los criterios anteriores se puede realizar una evaluación embrionaria que permite clasificar las estructuras en grados de calidad en términos cuantitativos, y así establecer posibilidades de desarrollo y posterior nacimiento de un ternero del embrión obtenido, existen distintas escalas de calidad embrionaria, hay que aclarar que tanto la observación *per se*

como la diferenciación entre un grado y otro es subjetiva y depende en gran parte de la experiencia del operador. De esta manera se nos presentan los siguientes grados:

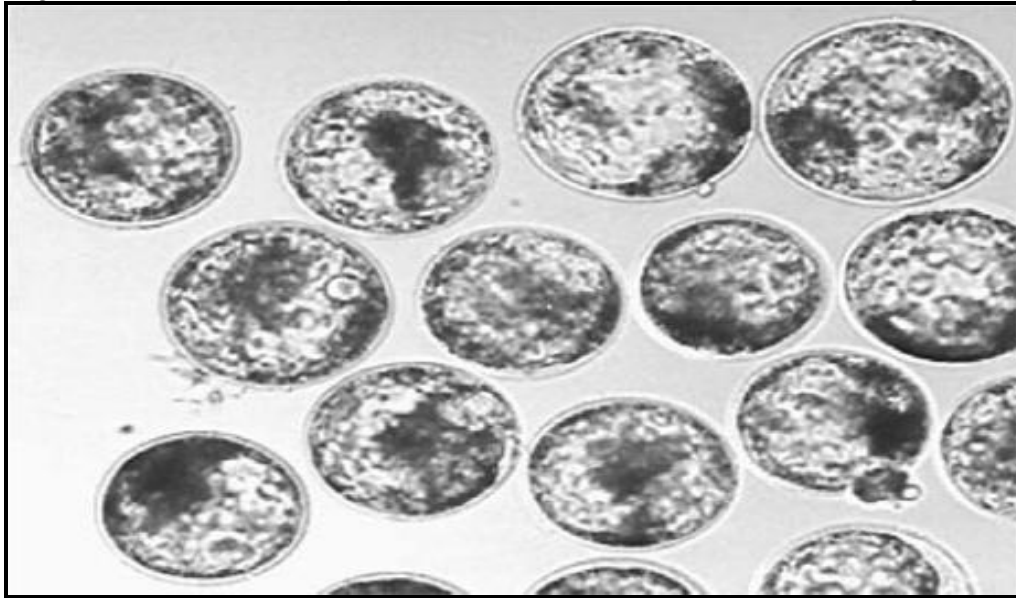
- G1: Excelente, el desarrollo corresponde al día de la recolección. No existen defectos visibles. Los blastómeros son claramente visibles, de color y de estructura uniforme, simétricos de forma esferoide y la zona pelucida esta intacta (Figura 15, 17,18 y 19).
- G2: Bueno, el embrión tiene muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y posee una pequeña cantidad de detritus celulares. Su forma puede ser ligeramente irregular.
- G3: Regular, el embrión posee varios defectos como son detritus celulares, forma irregular, de color muy oscuro o muy claro y ligero apretamiento en la zona pelucida (Figura 16).
- G4: Malo, el embrión posee muchos defectos como son la ruptura de la zona pelucida, en ocasiones puede encontrarse parcialmente fuera de allá, forma asimétrica marcada, tendencia a la desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros. Esta categoría es no transferible (Palma, 2008).

Figura 15. Blastocisto expandido, MCI (Masa celular interna) bien distribuida.



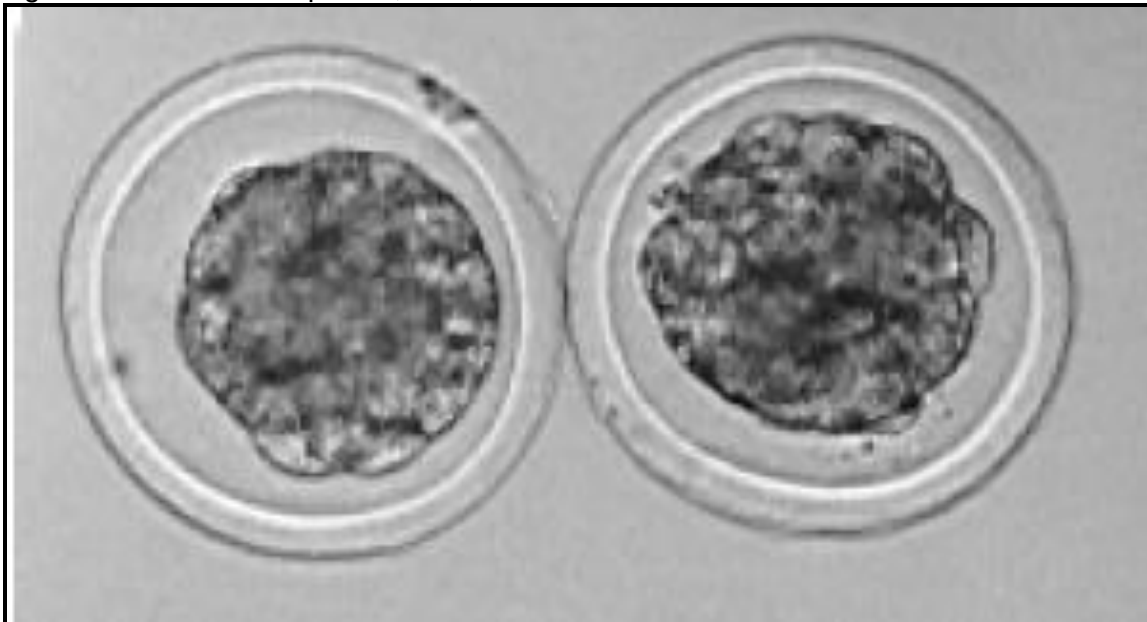
Tomado de: Palma (2008)

Figura 16. Blastocistos expandidos GIII, MCI distribuida de forma irregular.



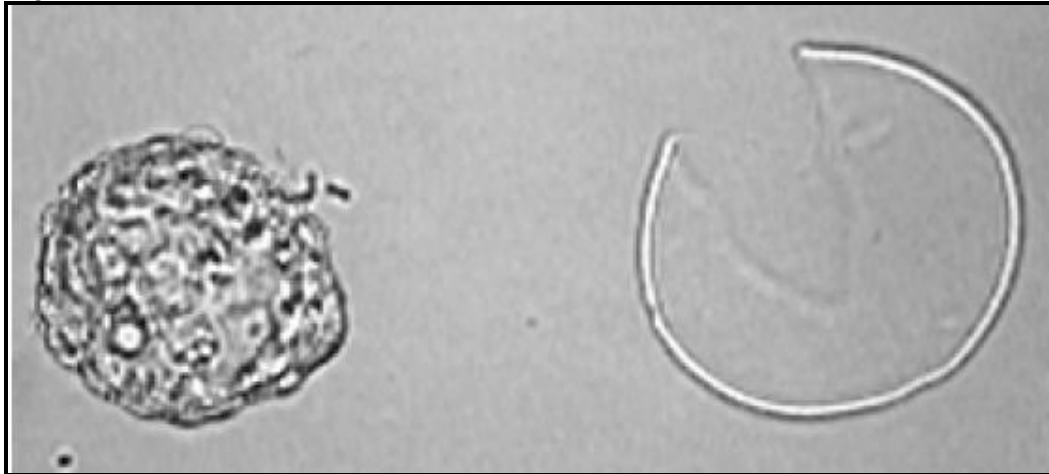
Tomado de: Palma (2008)

Figura 17. Mórulas compactas, GI-II,



Tomado de: Palma, 2008

Figura 18. Blastocisto Protruido GI



Tomado de: Palma, 2008

El éxito del trasplante de embriones tiene como base una buena evaluación del embrión, embriones que fueron clasificados como excelentes o buenos tienen grandes posibilidades de terminar como preñeces exitosas, entre un 60 a 70%, por el contrario, embriones clasificados como dudosos resultan en porcentajes de preñes menores, sin embargo, a pesar de evoluciones embrionarias hechas de forma correcta hay reportes de casos donde embriones clasificados excelentes luego de una perfecta transferencia no concluyen en una preñez mientras de baja calidad concluyeron en preñeces exitosas (Palma, 2008).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto fue llevado a cabo en la Ciudad de Bogotá, Distrito Capital, a 2600 msnm con una temperatura promedio de 14 °C. El predio donde permanecieron los animales y se llevo a cabo todos los procedimientos de laboratorio y quirúrgicos se ubica en el barrio San Antonio Norte, en la sede norte de la Universidad de la Salle.

El proceso de investigación comenzó con la elección de los animales a utilizar, se eligieron 4 ovinos hembra sanas de la raza criolla colombiana, con una edad que oscila entre 1 y 5 años, se procedió entonces a evaluar el estado reproductivo de los animales, determinando que las hembras se encontraban vacías. Se procedió entonces a separar las hembras de los machos y a marcar cada una con números consecutivos en el cuello (Figura 19).

Figura 19. Selección de animales.



En el día 0 según cronograma, se obtuvieron los ovarios frescos de vacas de matadero recuperados del Frigorífico de Zipaquirá y del Frigorífico BLUE. El proceso de recolección de ovarios frescos se realizó bajo las especificaciones y recomendaciones de manejo dadas por el personal del Laboratorio de Reproducción VITROGEN (Figura 20).



Figura 20. Resumen gráfico de la metodología implementada.



Se obtuvieron 74 ovarios tomados directamente de la canal bovina, fueron sometidos a un lavado con solución salina al 0,9% a una temperatura de 30 – 37,5 °C para eliminar los excesos de sangre y otros posibles contaminantes y mantenerlos en un ambiente y temperatura estables y propicios para la supervivencia de los oocitos, posteriormente fueron empacados en bolsas plásticas y almacenados en termos con solución salina al 0,9% limpia a una temperatura de 30 – 34 °C, para su posterior transporte al Laboratorio de Reproducción VITROGEN.

Ya en el laboratorio, los ovarios fueron colocados en la máquina baño maría (Figura 21) en un medio compuesto por solución salina al 0,9% mezclada con antibiótico y en una temperatura estable de 37 °C, esto con el fin de eliminar cualquier tipo de contaminación bacteriana y prepararlos para el procedimiento de Aspiración Folicular (OPU).

Figura 21. Ovarios de matadero inmersos en solución de mantenimiento, introducidos en la máquina baño de maría a 37 °C.



Para el proceso de aspiración folicular (OPU), se extrajo cada ovario de la solución de mantenimiento y se procedió a secarlos con una gasa. La aspiración de folículos entre 2 y 7 mm de diámetro se realizó mediante una jeringa de 10 ml y aguja calibre 18G; el líquido folicular obtenido se depositó en un tubo Falcon de 50 ml y se dejó decantar por 20 minutos antes de hacer la selección de los complejos cúmulus-ooocito aptos para maduración donde se tuvieron en cuenta los parámetros usados para la evaluación morfológica de oocitos. Al finalizar la evaluación, se clasificaron los oocitos por calidades y se dividieron en grupos dejándolos en cajas de Petri marcadas (Figura 22).

Figura 22. Colocación de oocitos en las diferentes cajas de Petri.



Posteriormente se lleva a cabo la maduración, se realizó en gotas de medio TCM- 199 suplementado con 10% SFB (suero fetal bovino), LH (0,005 mg/ml), FSH (0,02 mg/ml) y 17  $\beta$ -estradiol (0,005 mg/ml) bajo aceite mineral, se colocaron 30 oocitos por gota con 50  $\mu$ l y se llevaron a incubar por 24 h a 5% CO<sub>2</sub>, 38 °C, 90% humedad y oxígeno ambiental 20%.

Seguidamente el día 1 se llevo a cabo el proceso de Fertilización In Vitro (FIV), el semen criopreservado de un toro de la raza Cebú se descongeló a 37°C por un minuto y se realizó una capacitación mediante un gradiente discontinuo de Percoll 90/45, para separar la fracción motil o espermatozoides viables. Mediante conteo en cámara de Neubauer se ajustó la concentración final a 1x10<sup>6</sup> espermatozoides por mililitro (Figura 23 y Figura 24).

Figura 23. Materiales usados para la descongelación del semen bovino criopreservado.

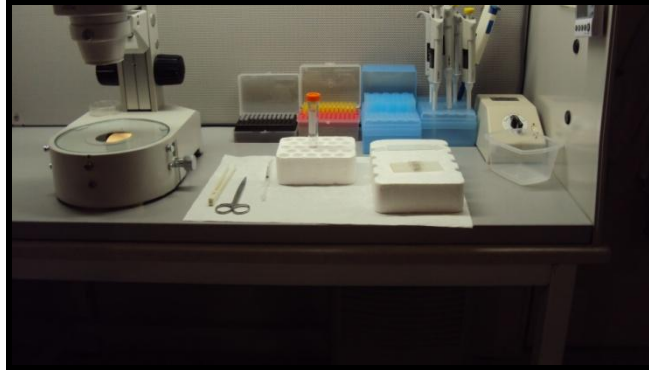
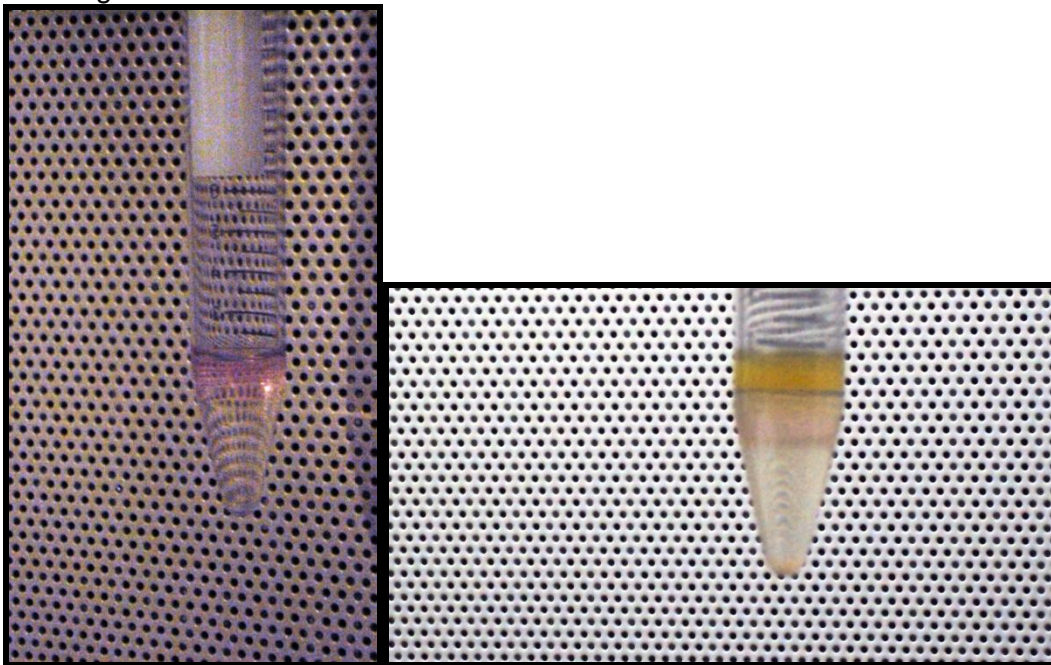


Figura 24. Percoll antes de la adición de espermatozoides y después de la centrifugación.



Después de 24 h de maduración los oocitos fueron lavados en Hapes de trabajo y puestos en medio de fertilización TALP (Tyrode™s albumina lactato piruvato) manteniendo los grupos en los que anteriormente se habían designado. Se inseminó con 2½l del semen previamente seleccionado, 2½l heparina y 2½l PHE (penicilina, hipotaurina, epinefrina) y posteriormente se llevaron a incubación por 48 horas para la interacción de gametos con 5% CO<sub>2</sub>, 38°C, 90% humedad y oxígeno ambiental 20%.

El día 3, después de las 48 horas de cultivo se observan las estructuras y se seleccionan, tomando las que entraron en proceso de clivaje y desechando las que no entraron en este

proceso. Se divide el número de estructuras en 5 (incubadora artificial y 4 ovejas), las estructuras que quedan seleccionadas para la incubadora se procede a ingresarlas de nuevo a la máquina. Las estructuras seleccionadas para las ovejas se mantienen en cajas de Petri, en gotas de medio de transferencia, manteniendo la agrupación que se implementó desde el inicio, mientras se preparaba el procedimiento quirúrgico para que al darse la orden, las estructuras fueran cargadas en los catéteres de transferencia previamente marcados.

## 2.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Antes del procedimiento se llevó a cabo un ayuno de 24 horas de alimento sólido y de 6 horas de agua como preparación quirúrgica para las ovejas. Se utilizaron fármacos aprobados por el ICA y su uso estará bajo la supervisión de personal experto en el manejo de los mismos. Se implementó como protocolo de anestesia una mezcla de 19 ml de Solución Salina Fisiológica, 5 ml de Ketamina al 5% y 1 ml de Xilacina al 2%, de esta mezcla se utilizó una dosis total de 1 ml por cada 50 Kg de peso vía intramuscular profunda. Las técnicas para la transferencia de embriones en animales menores son: técnica quirúrgica (laparotomía medial), la cual va a ser la técnica utilizada y la técnica por laparoscopia.

### 2.1.1. Técnica quirúrgica

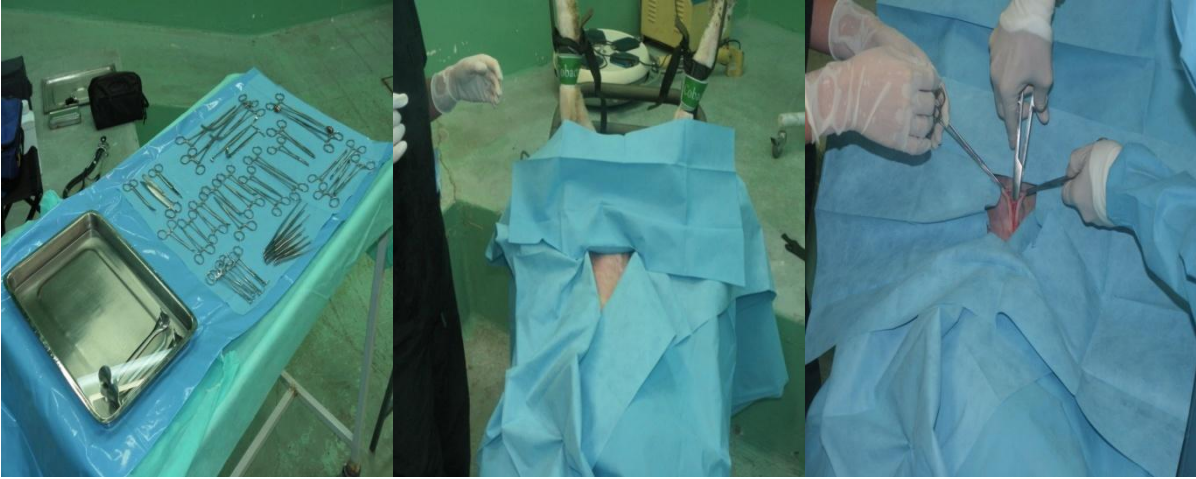
La hembra se ubica en el plano inclinado de una camilla (cabeza hacia abajo) se rasura y desinfecta el campo operatorio. Se realiza una laparotomía medial de 5 a 7 cm, y a 3 cm por delante de la ubre (Figura 25 y Figura 26).

Figura 25. Ubicación y preparación del animal para el procedimiento quirúrgico.





Figura 26. Inicio del procedimiento quirúrgico.



Antes de comenzar la transferencia embrionaria se realiza la exteriorización de los ovarios (Figura 27 y Figura 28), para determinar la respuesta ovulatoria (número de cuerpos lúteos).

Figura 27. Ovarios de oveja en su posición anatómica normal.

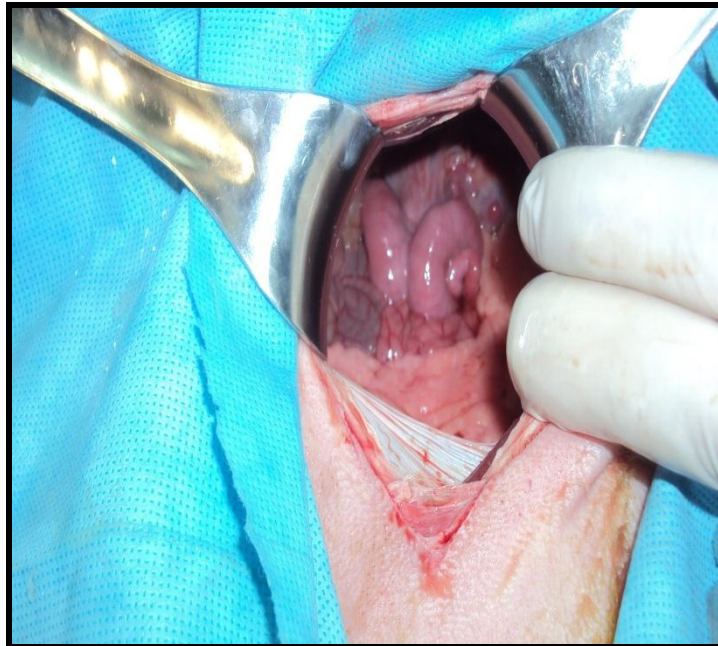
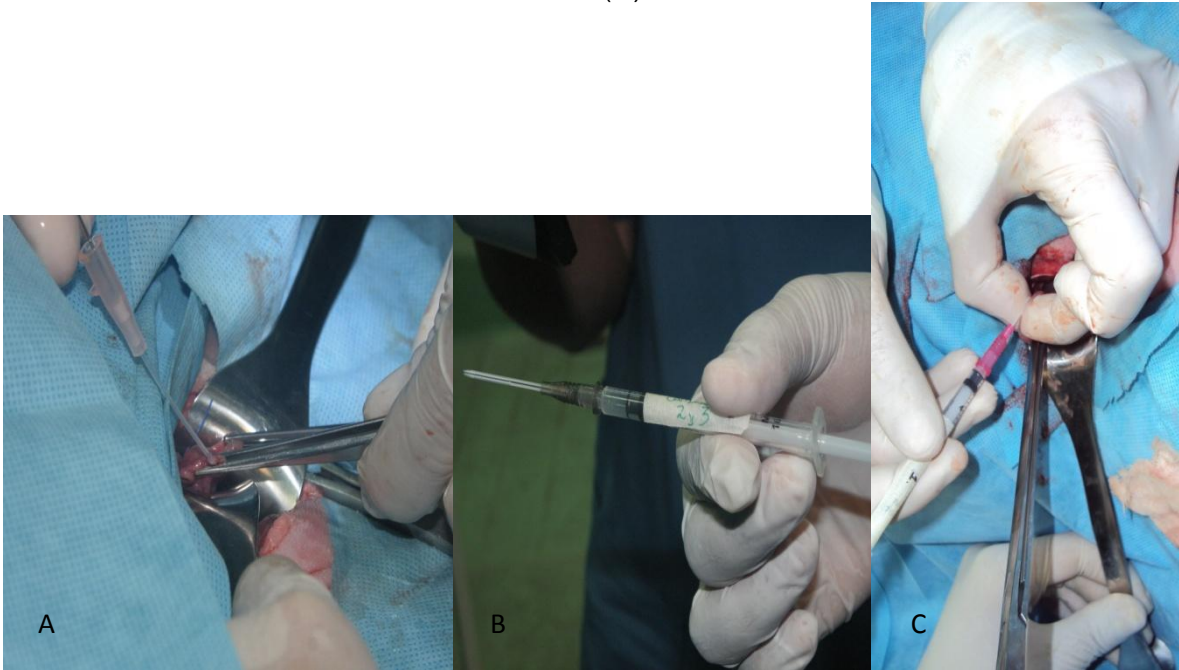


Figura 28. Ovario con cuerpos lúteos y cuerpos hemorrágicos.



La intervención de transferencia de embriones consiste en la introducción de un catéter guía en la unión útero-tubal por donde se hace una punción por la cual entra el catéter en donde se cargaron los embriones siempre manteniendo los grupos de referencia (calidad de oocitos), se transfirieron 42 embriones por oveja, 18 embriones en el oviducto derecho y 24 embriones en el oviducto izquierdo, como se puede observar en la Figura 29. Los embriones permanecieron 4 días incubándose en el oviducto de las ovejas. Posterior a la transferencia de los embriones en cada oviducto, se procede a lavar la cavidad peritoneal con 250 ml de solución salina heparinizada y posteriormente se procedió a suturar todos los planos quirúrgicos, limpiar la piel y los puntos externos, inyectar la dosis de antibiótico profiláctico, para así poder dejar al animal en pesebrera.

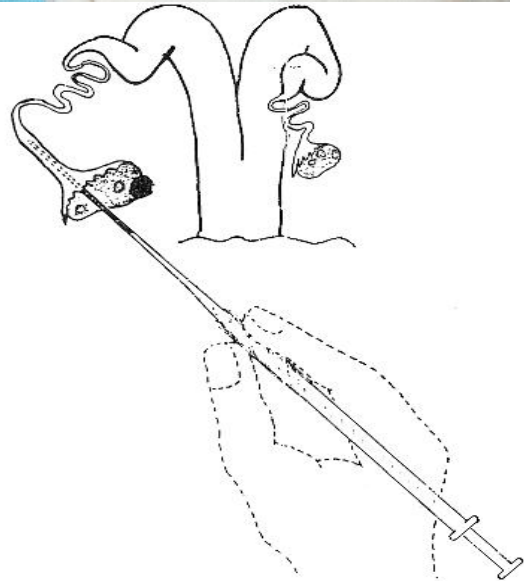
Figura 29. Paso del catéter guía (A), catéter con los embriones cargados (B) y transferencia de los embriones directamente en el oviducto (C)



El día 6, en el procedimiento quirúrgico para el lavado oviductal y extracción de los embriones se prepara de la misma manera que en la transferencia. Cuando se tiene expuesto el útero y el oviducto, se procede a hacer una pequeña incisión en el cuerpo del útero, por este pequeño agujero se procede a introducir una Sonda Foley calibre 10 (K10) y se procede a inflar el balón de la sonda, para fijarla a la entrada de la unión útero-tubal. Ya fijada la sonda, se realiza la introducción de un catéter por la unión útero ovárica por el cual se procede a hacer el lavado. Se llena una jeringa de 20 ml con medio PBS, se acopla con el catéter y se descarga el contenido, de esta manera se produce una corriente de arrastre que fluye hacia el oviducto y sale por la sonda hasta una caja de Petry de búsqueda de colecta previamente entibiada. Este proceso se realiza dos veces por oviducto. (Gibbons, 1995)



Figura 30. Técnica quirúrgica de recuperación embrionaria y recolección de medio de lavado en caja de petry.



Tomado de: Gordon (2006)

Terminado el lavado, se lleva al laboratorio la caja Petry de recolección para la búsqueda de estructuras y evaluación de calidad embrionaria según los parámetros morfológicos referidos en el marco teórico. Ya con estos resultados se procede a evaluar los embriones que quedaron en la máquina incubadora, se analizan y se interpretan los datos comparando incubación In Vivo vs In Vitro.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. RECOLECCIÓN DE OOCITOS

Con la aspiración de los ovarios provenientes de la planta de sacrificio se pudo obtener muy buenos resultados, 1052 oocitos de 74 ovarios, esta cantidad de oocitos nos promedia alrededor de 14.21 oocitos por ovario es decir aproximadamente 28.4 oocitos por hembra sacrificada, estos datos superan a los presentados por Hernández, Nava y Vílchez (2010), quien aspiró trescientos ovarios de bovinos mestizos obtenidos de matadero para determinar el efecto de la técnica de recolección (Aspiración y Slicing), sobre la cantidad y la calidad de oocitos, obteniendo resultados alrededor de  $4,58 \pm 1,05$  con la técnica de aspiración.

Los resultados reportados en esta investigación coinciden con la información presentada por Pavlok y col (1992). El cual reporta un rendimiento de 10 a 20 oocitos por ovario con esta técnica. Pontes et al. (2009), realizó otro estudio hecho en Brasil donde se recuperaron un total de 2463 oocitos recolectados en 96 sesiones de OPU realizadas a 30 vacas donantes arrojando resultados de  $25,6 \pm 15,3$  oocitos aspirados de los cuales 89,3% se consideraron viables, estos resultados están por encima de los vistos en este estudio, es importante resaltar que estas aspiraciones fueron hechas en hembras de la raza Nelore que es una de las razas que mas produce oocitos.

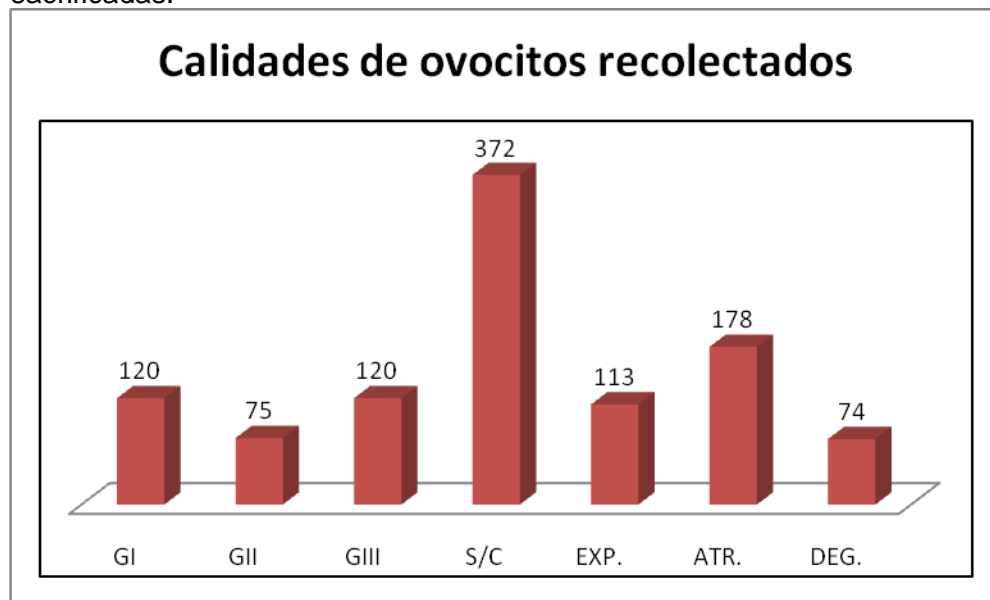
Aller (2000) utilizó 237 ovarios de vacas ovariectomizadas de las cuales obtuvo 2262 oocitos es decir alrededor de 9.5 oocitos por ovario, estos resultados se pueden admitir en el rango de buenos. El éxito de la obtención de un gran número de oocitos en este proyecto se debe al correcto manejo de los ovarios en cuanto a temperatura ya que nunca se supero la temperatura recomendada de  $37.5^{\circ}\text{C}$  y el tiempo de conservación el cual fue de aproximadamente 3 horas desde el momento del sacrificio del animal, el transporte y el trabajo en laboratorio, este ultimo de gran importancia pues se utilizo la técnica de aspiración por medio de jeringa y aguja la cual requiere manejar presiones exactas para evitar dañar los oocitos recuperados (Figura 31).

Figura 31. Aspiración en el laboratorio, de izquierda a derecha, lavado de ovarios con solución salina a 37.5 C, aspiración folicular con jeringa 5 ml y aguja 18g y oocitos aspirados en medio de colecta.



Las calidades de las oocitos recolectadas fueron las siguientes; 120 Grado I (GI)(Figura 33), 75 Grado II (GII) (Figura 34), 120 Grado III (GIII) (Figura 35), 372 sin células del cúmulo o desnudos (S/C), 113 expandidos (EXP), 178 atresicos (ATR) y 74 degenerados (DEG) (Figura 32). Estos resultado están por debajo de los reportados por Hernández A y col, (2010), quien obtuvo 76.6% de oocitos calidad buena. Otros resultados obtenidos por Aller (2000), de 2262 oocitos obtuvo alrededor de 27.9 % de oocitos con calidad buena están más acorde con los resultados obtenidos en este estudio los cuales están alrededor de 30% de oocitos de calidad idónea para madurar in vitro.

Figura 32. Calidades de oocitos aspirados de ovarios de hembras sacrificadas.



El número oocitos atresicos y degenerados reportados en este estudio se explica debido a que los oocitos desarrollados in vivo tienen una compleja y dinámica relación con diferentes entornos. En primer lugar en el folículo ovárico donde el oocito alcanza el crecimiento y la maduración completa, luego, en las diferentes porciones del oviducto durante la fertilización y desarrollo embrionario temprano y, finalmente, en el útero en el momento de la implantación y termino del desarrollo embrionario, cada evento en un microambiente específico, otra causa documentada de incompetencia por parte del oocito es la segregación cromosómica, se ha comprobado que alrededor del 15% de oocitos cultivados in vitro poseen anomalías cromosómicas. En cambio, in vivo la maduración de los oocitos permite el cumplimiento de su capacitación bajo el dominio folicular antes de la maduración final provocada por el pico de LH preovulatorio.

En este período el oocito experimenta muchos cambios en pro de su maduración, como son, la ubicación de organelos, la actividad nuclear, la expresión génica, la síntesis de proteínas, todo esto para adquirir un pleno desarrollo, lo cual no se cumple a la perfección en los medios de cultivo in vitro (Holm y Henrik, 1998).

La gran cantidad de oocitos desnudos (372) se puede explicar debido a la técnica ya que la presión ejercida por la jeringa en el momento de aspirar los ovarios suele causar un porcentaje normal de daño en las células del cúmulo de los oocitos, pudiéndolos dejar semi o completamente desnudos.

Figura 33. Oocitos G1, se observa, Cúmulo con capas múltiples, Cúmulo compacto, La totalidad del CCO es clara y transparente y Citoplasma homogéneo.

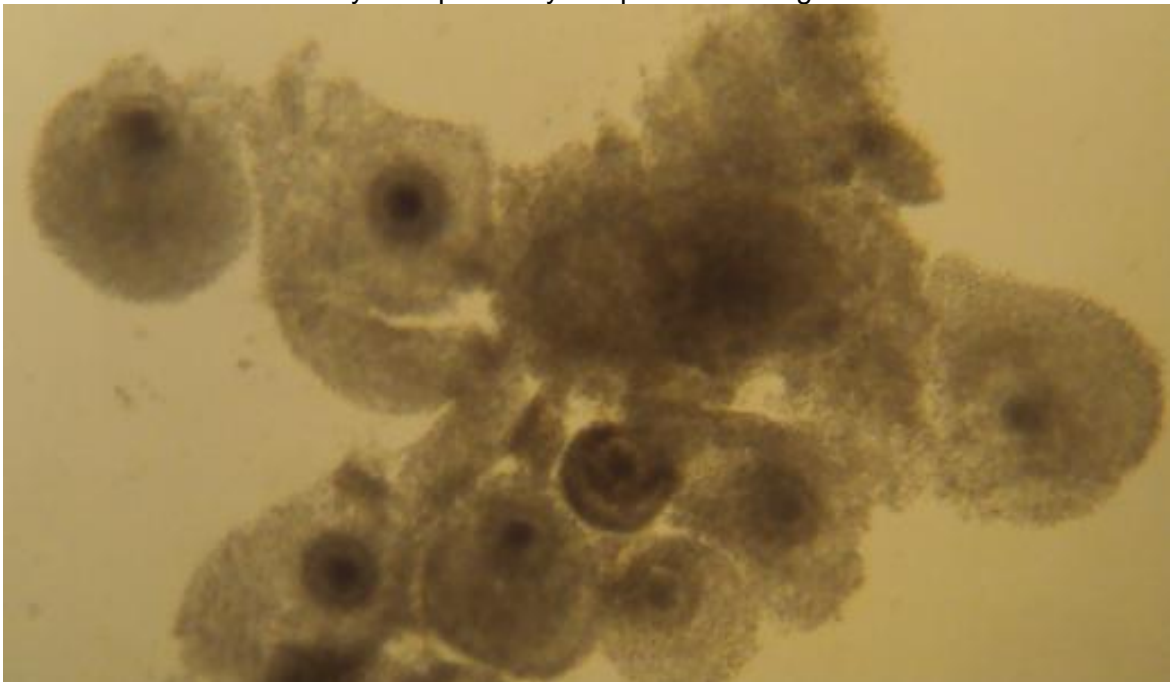


Figura 34. Oocitos GII, células de cúmulus como GI o algo más oscuro y menos transparente.

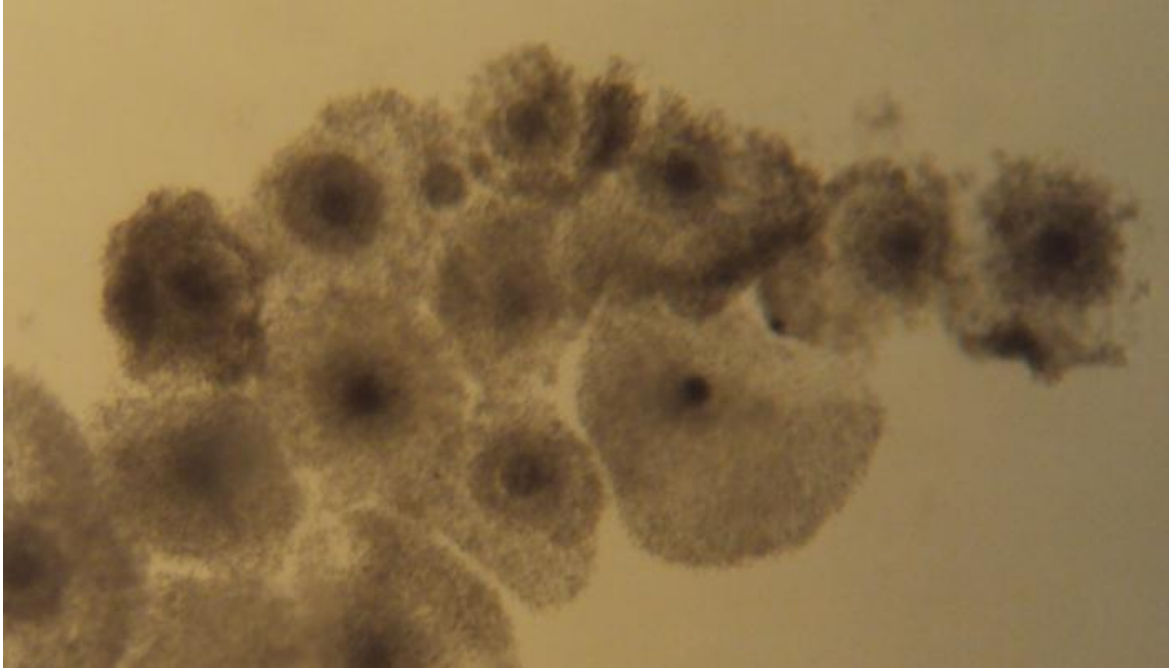
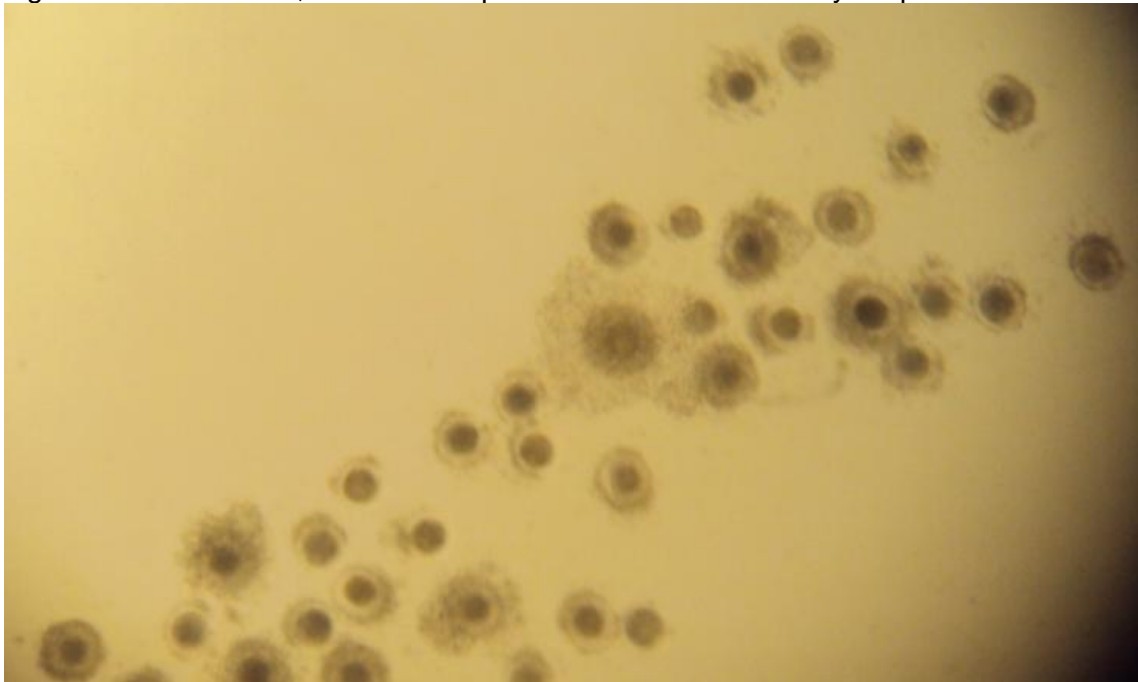


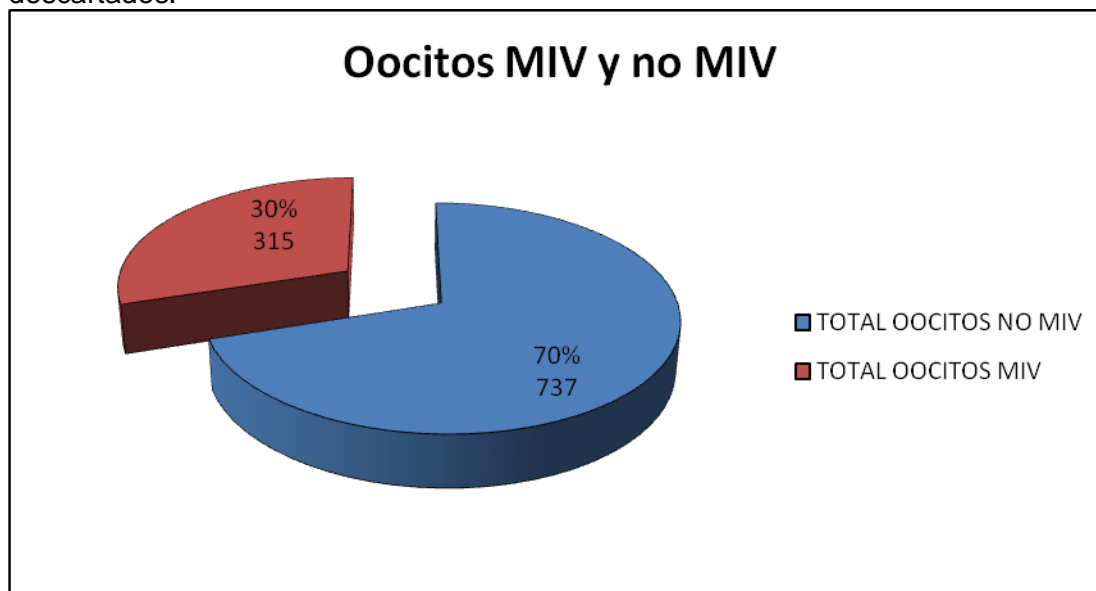
Figura 35. Oocitos GIII, se observan pocas células del cúmulus y citoplasma oscuro.



### 3.2. MADURACIÓN IN VITRO (MIV)

De la totalidad de los oocitos obtenidos (1052) se utilizaron 315 para el protocolo de maduración in vitro, es decir solo los oocitos GI, GII y GIII, los que representan un 30% del total aspirado (Figura 36).

Figura 36. Porcentajes de embriones que se utilizaron para Madurados In Vitro (MIV) y descartados.



Los oocitos que se destinaron a MIV mostraron diferencias en cuanto al porcentaje de clivaje, esta diferencia está relacionada directamente con el grado de calidad de los oocitos (Figura 39), esto se demostró por medio de prueba estadística Chi Cuadrado, con la cual se descarto la hipótesis nula y se acepta la dependencia de las variables. De esta forma se observó que los oocitos Grado 1 tuvieron mayor porcentaje de clivaje que los oocitos grado 2, 88.5% y 66% respectivamente, a su vez los oocitos grado 3 fueron inferiores que los grado 1 y 2, con un 49% de clivaje (Figura 37 y Figura 38).

Figura 37. Porcentaje de oocitos que clivaron después de la FIV según la calidad de los mismos.

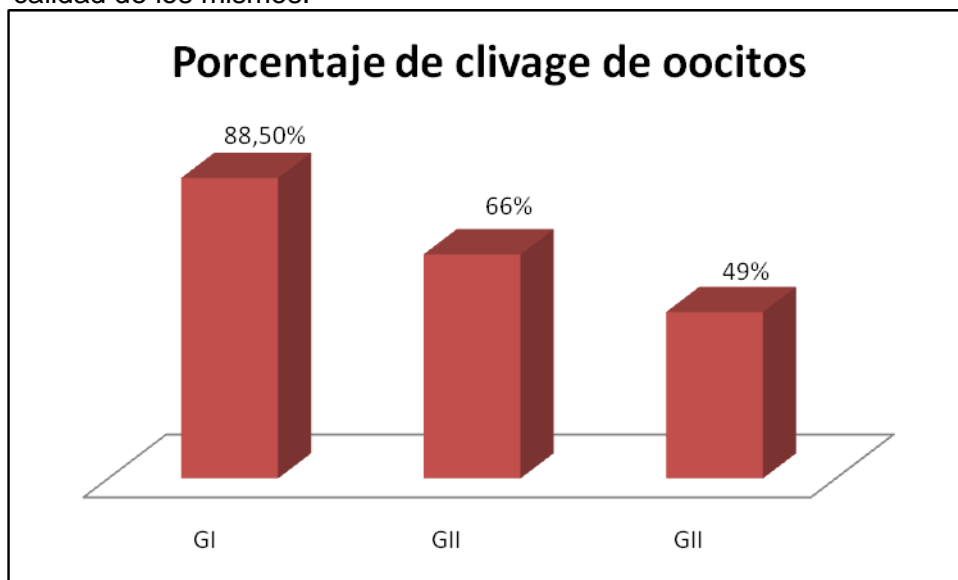
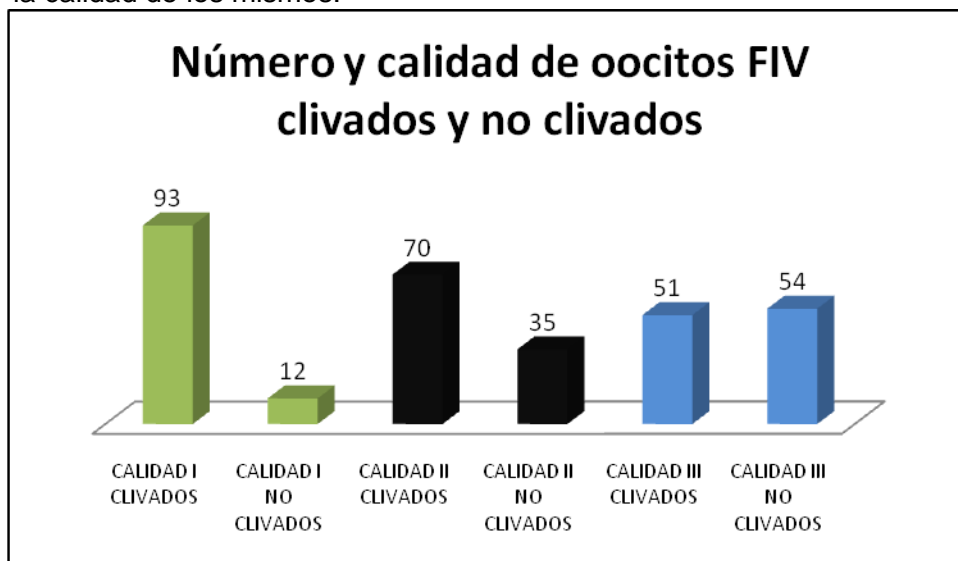


Figura 38. Número y calidad de oocitos FIV clivados y no clivados según la calidad de los mismos.



Estos resultados concuerdan con lo observado por Palma (2008), este investigador reportó que de 84 oocitos grado 1 destinados a MIV el 100% tuvo una maduración completa y óptima, el mismo autor estudió otro grupo de 79 oocitos grado 1 que fueron FIV y de los cuales 84.9% tuvieron una fertilización y clivaje normal.

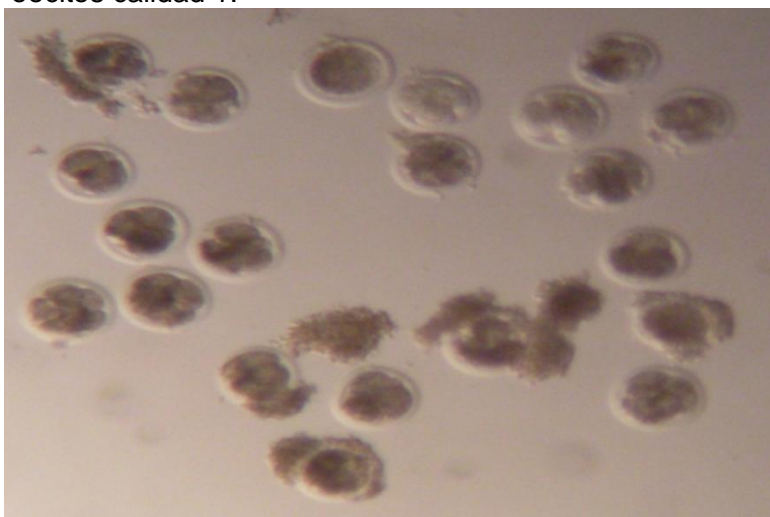
Palma (2008) estudió también el comportamiento de oocitos grado 2 en los cuales obtuvo unos porcentajes de maduración de 60.7% y 79.6% en el caso de la FIV y posterior división, lo cual es muy similar a lo obtenido en este estudio.

Estos resultados demuestran que oocitos de calidad 1 rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo, que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiada, también oocitos que presentan un ooplasma oscuro muestran una acumulación de lípidos y un buen potencial para el desarrollo, mientras que los que presentan un citoplasma pálido tienen una baja densidad de orgánulos y escaso potencial de desarrollo. Por otra parte, cuando el ooplasma es negro, los oocitos están envejecidos y tienen un potencial muy bajo para soportar el desarrollo (Nagano et al., 2006). Factores tales como la calidad de los oocitos, la tensión de oxígeno, la densidad de embriones, y el tipo de sustrato de energía durante la producción in vitro de embriones pueden afectar la tasa de preimplantación y el desarrollo del embrión. La calidad morfológica del oocito basado en la solidez y el número de capas de células del cúmulo tiene efectos positivos sobre las tasas de maduración in vitro, la fertilización y el porcentaje de clivaje posterior.

Un oocito maduro debería cumplir gran cantidad de procesos para dar origen a un embrión viable, estos procesos incluyen la adquisición de las proteínas espermáticas de los receptores y moléculas de señalización en el ooplasma para permitir la fertilización, acumulación de calcio intracelular para transmitir señales, ejecución del bloqueo contra la poliesperma, maduración del núcleo con una apropiada segregación de cromosomas, producción de agentes reductores y otras moléculas necesarias para la descondensación del núcleo, desarrollo del citoesqueleto y la síntesis y almacenamiento de mRNA.

Todo lo anterior es la clave para el éxito de un embrión saludable y está directamente relacionado con la calidad del oocito, es decir, oocitos calidad 1 darán mejores embriones que los oocitos calidad 2 y estos a su vez que darán mejores embriones que los calidad 3 (Holm y Henrik, 1998).

Figura 39. Embriones de 2 - 4 células obtenidos por FIV de oocitos calidad 1.

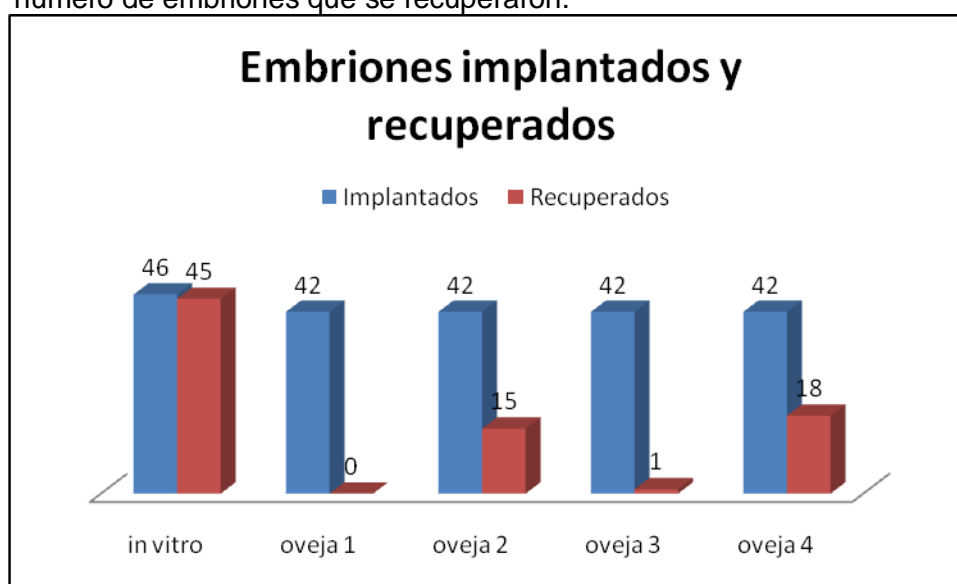




### 3.3. RECUPERACIÓN DE EMBRIONES

La recuperación embrionaria fue uno de los principales inconvenientes en este proyecto, se obtuvieron los siguientes porcentajes de recuperación; la oveja 1 tuvo 0% es decir 0 embriones de 42 que se implantaron, la oveja 2 tuvo 35.7% de recuperación es decir de 42 embriones implantados se recuperaron 15, la oveja 3 tuvo 2.3% de recuperación embrionaria lo que equivale a 1 embrión recuperado de 42 implantados, de la oveja 4 se recupero el 42.8% lo que equivale a 18 embriones de 42 implantados y para el grupo in vitro se recupero el 97.8% lo que equivale a 45 embriones de 46 que se incubaron (Figura 40).

Figura 40. Número de embriones que se implantaron en cada grupo y número de embriones que se recuperaron.



En general, los resultados mostraron una cantidad baja de embriones recuperados, lo cual contrasta con los estudios de diferentes autores.

Wetscher (2005), reportó 234 (56.1%) embriones recuperados de cuernos bovinos por medio de lavado, de 417 cigotos rodeados de una buena cantidad de células del cúmulo, el mismo autor reportó un número más bajo de embriones recuperados al implantar cigotos desprovistos o con baja cantidad de células del cúmulo, solo 161 de 544 implantados es decir el 29.6% de recuperados.

Parra (2007) presentó resultados de alrededor del 58% de recuperación embrionaria en ovejas. La recuperación se realizó a los 7 días de implantados usando una técnica quirúrgica por medio de laparoscopia. El mismo autor en otro estudio utilizó un catéter Foley 8F en los cuernos uterinos perforando la pared de su base, el catéter fue anclado inflando el globo con 5 ml de aire, procediendo a infundir el medio (5 lavados de 5-6 ml cada uno), se realizó un masaje del CU y se recolectó el medio a través del mismo catéter, obteniendo 75.4% de recuperación. Otro estudio en el que se trasplantaron 34 embriones ovinos a ovejas receptoras dio como resultado un promedio de 8 embriones recuperados por animal



es decir el 30.7%. Esto por medio de la técnica quirúrgica y posterior lavado de oviductos y cuernos (Ugalde et al., 1998).

El oviducto ovino presenta ciertas características anatómicas a las que se les puede otorgar un porcentaje de responsabilidad en cuanto a los resultados obtenidos, es decir, que dificultan la recuperación embrionaria. La estrechez de la unión uterotubárica y del oviducto de la especie ovina son características que causan dificultades en el paso de los embriones del oviducto al útero causando que el flujo de colecta sea lento y no siempre arrastre los embriones (Schiewe y Howaerd, 1990). Otro factor que pudo influenciar en los resultados es el día de colecta de los embriones, el cual en este experimento fue 6 días después de la transferencia, y se reporta que en ovejas la colecta embrionaria se realiza en los días séptimo u octavo después de la transferencia. Debido a que el desarrollo embrionario inicial en esta especie presenta un retraso de 12 a 24 horas que también demora el desplazamiento a través del oviducto y posterior llegada al útero.

La técnica quirúrgica utilizada presentó ciertos problemas en el momento de la recolección, esto debido al tamaño de las estructuras anatómicas (oviductos y cuernos) las cuales eran muy pequeñas y la dificultad para trabajar con los instrumentos destinados a la recolección (Figura 41). Los instrumentos utilizados para hacer el lavado constaban de la parte blanda de un yelco 18 G conectado a una jeringa con medio de recuperación que se introducía por la fimbria haciendo el lavado en pro de recuperar los embriones en el respectivo cuerno con una sonda Foley que terminaba en una caja de Petri. Los problemas que se presentaron en el momento de recuperar las estructuras fueron básicamente, la poca luz de los órganos por lo que los embriones pudieron no ser arrastrados hasta la sonda Foley, otra dificultad era encontrar la fimbria para poder introducir el yelco y hacer el lavado, otro problema que se presentó fue con la sonda Foley la cual se solía tapar con moco y detritos celulares, todo esto contribuía al abandono de embriones en las ovejas.

Figura 41. Técnica quirúrgica de recuperación embrionaria y recolección de medio de lavado en caja de petry.



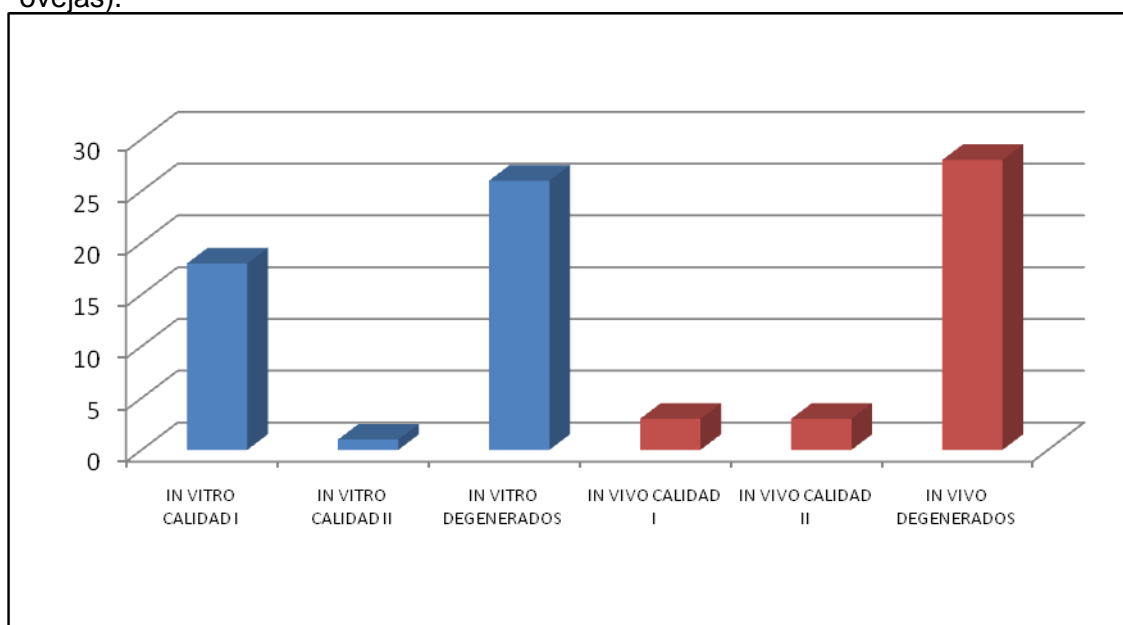
Las adherencias fueron otro factor que afectaron el porcentaje de recuperación, la oveja 1 y 2 a las cuales se les recupero 0 y 15 embriones respectivamente mostraron presencia de adherencia en el oviducto lo cual se evidencio a poner resistencia al paso del yelco y del medio de recuperación, en estas ovejas también se encontró a nivel de los cuernos presencia de pus en cantidades bajas posiblemente de alguna contaminación ocurrida en la cirugía de implantación.

### 3.4. IN VITRO VS. IN VIVO

A nivel estadístico si se toman todos los embriones incubados en las diferentes ovejas como un solo grupo y se compara con el grupo de embriones in vitro se obtiene por medio de una prueba estadística Chi Cuadrado una relación directa entre la calidad de los embriones y el método de incubación.

Con la Prueba Chi Cuadrado se demostró que los embriones producidos totalmente en el laboratorio mostraron mejores resultados en cuanto a cantidad de embriones de buena calidad que los embriones incubados en oviductos ovinos (Figura 42), sin embargo se observo que los pocos embriones de buena calidad recuperados de las ovejas mostraban ciertos atractivos en cuanto a su morfología que los hacían superiores a los in vitro.

Figura 42. Calidad y cantidad de embriones recuperados in vitro vs in vivo (grupos de ovejas).



Al tomar los embriones incubados en cada oveja y los embriones producidos en el laboratorio como grupos diferentes la Prueba de Chi Cuadrado acepta la hipótesis nula lo que quiere decir que no hay ninguna relación entre las variantes, lo que se comprueba con las diferencias entre ellas tanto en la cantidad de estructuras recuperadas como en la calidad

y estado de las mismas. De la oveja 1 no se pudo recuperar ninguna estructura, de la oveja 2 se recupero 1 embrión grado 2 y 14 degenerados, de la oveja 3 solo se recupero 1 embrión degenerado y por último de la oveja 4 se recuperaron 3 embriones grado 1, 2 grado 2 y 13 degenerados. De los embriones que se obtuvieron in vitro, 18 fueron grado 1, 1 grado 2 y 26 degenerados.

Tabla 9. Estado de desarrollo embrionario de las estructuras recuperadas sin importar la calidad embrionaria.

<b>Desarrollo</b>	<b>In Vivo</b>	<b>In Vitro</b>
<b>2-4 cel.</b>	1	2
<b>4-8 cel.</b>	13	5
<b>8-16 cel.</b>	14	10
<b>Mórula</b>	1	5
<b>Mórula compacta</b>		
<b>Blastocisto temprano</b>	1	
<b>Blastocisto</b>		22
<b>Blastocisto expandido</b>	2	1
<b>Blastocisto eclosionado</b>	2	

Los embriones grado 1 producidos in vitro correspondían a 17 blastocistos y 1 blastocisto expandido, el embrión grado 2 era 1 mórula y las 26 estructuras degeneradas eran 5 blastocistos, 4 mórulas y 17 embriones de 2-16 células.

La estructura grado 2 de la oveja 2 era 1 mórula mientras que los restantes 14 degenerados se encontraban en estado de 2 – 16 células, las estructuras de la oveja 3 era solo 1 embrión degenerado de 8 células y de la oveja 4 se pudieron recuperar 3 embriones grado 1, 2 blastocistos expandidos y 1 blastocisto inicial, 2 estructuras grado 2 que corresponden a 2 zonas pelucidas lo que se puede tomar como dos blastocistos eclosionado de los cuales solo se recupero su zona pelucida y 13 embriones degenerados en estado entre 2 -16 células (Tabla 9).

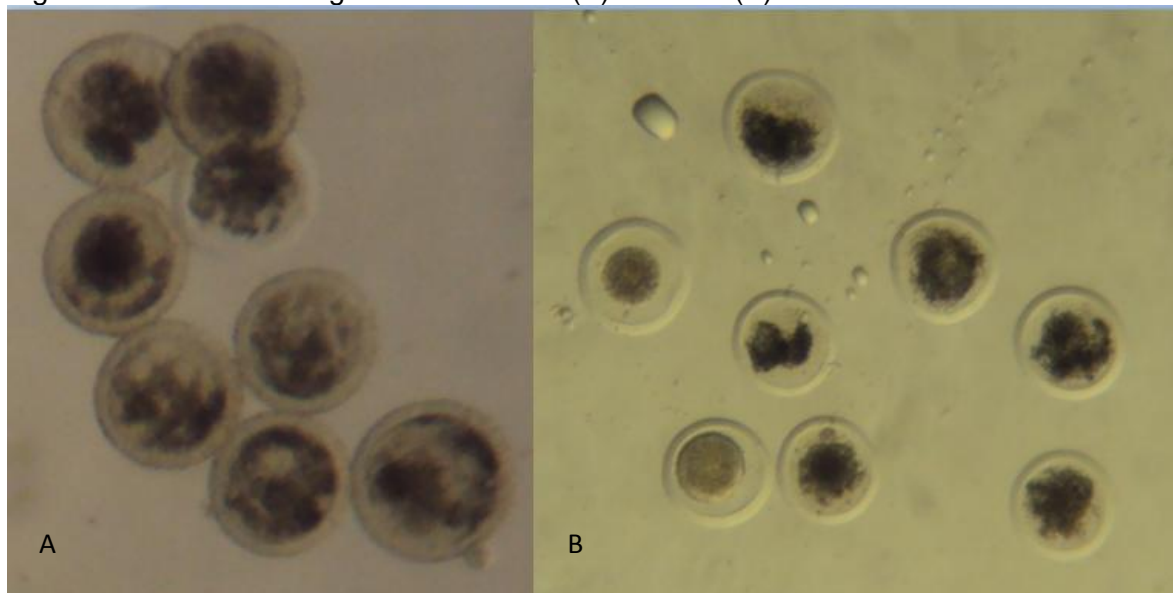
De todos los embriones incubados en los oviductos el 17.65 % del total de embriones recuperados eran viables, estos resultados no coinciden con estudios anteriores que reportan mayor supervivencia de embriones después de ser incubados por 6 días in vivo dando resultados de 51.3% de estructuras vivas y de buena calidad en el caso de embriones ovinos y 39.7% de estructuras viables para bovinos (Rizos, Fair y Papadopolus 2002). Estos resultados pueden tener explicación debido a la manipulación que se les hizo a los embriones para poder ser implantados en los oviductos de las ovejas, ya que debido a la dificultad que se presento en la técnica quirúrgica tanto en la implantación como en la colecta de los embriones se pudo haber generado alguna exposición a temperaturas extremas y a sustancias toxicas para los embriones.

Otro factor que pudo influir en la degeneración embrionaria son las adherencias y la presencia de pus que presentaron algunas ovejas lo cual pudo desestabilizar el ambiente oviductal y causar la degeneración de los embriones.

El grupo de embriones producidos in vitro también tuvo una presencia alta de embriones degenerados (Figura 43), 26 en total, lo que equivale al 62.2% del total de embriones producidos in vitro, esto se puede presentar por diversos factores como anomalías cromosómicas las cuales tienen una gran incidencia en embriones producidos in vitro, se ha reportado de 15 a 30% de incidencia, mientras que in vivo solo alcanza 7 a 10% de incidencia. Estudios preliminares demostraron que 72% de 151 embriones producidos in vitro eran mixoploides, ósea poseían dos o más líneas celulares, generalmente una con un número diploide (Holm y Henrik, 1998). Rizos, Fair y Papadopolus (2002) reportaron que 40 a 50% de embriones procedentes de animales domésticos madurados in vitro y fertilizados in vitro no alcanzan el estado de blastocisto. A pesar de esto, el 80% de los oocitos normalmente fertilizados alcanza un estado de clivaje de 2 células donde suele parar su división, con esto se podría pensar que el periodo post fertilización es una etapa crítica del rendimiento del embrión en cuanto a calidad.

La incidencia de la presentación de apoptosis en los embriones producidos in vitro puede dar una respuesta al porcentaje de embriones degenerados que se presentó en este grupo. Un estudio donde se utilizaron diferentes mecanismos para detectar los indicios de apoptosis en embriones de diferentes especies encontró que el porcentaje de daño celular por blastocisto fue significativo en embriones producidos in vitro, en equinos se evidenció 7% de presentación de apoptosis, en porcino el 10%, en ovinos el 9%, en caprinos el 10% y en bovinos el 16%. Otro motivo por el cual se pudieron dar estos resultados en el grupo in vitro pudo ser la metodología usada en laboratorio, es decir, tiempo de incubación, medios utilizados, exposición de los embriones a posibles medios físicos y químicos extremos, entre otros (Pomar, 2005).

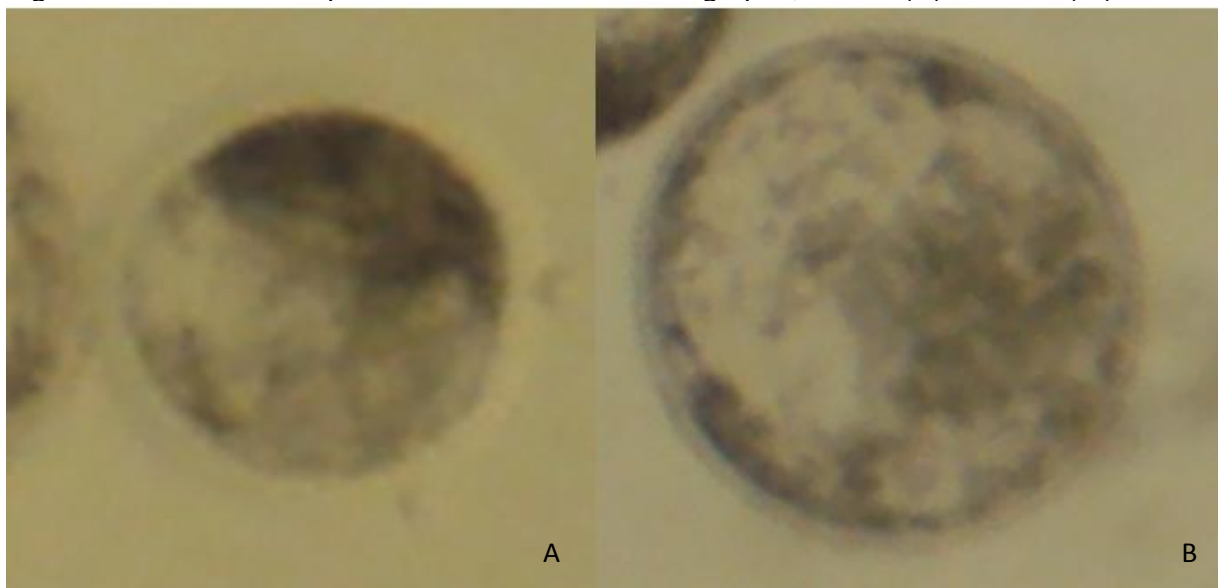
Figura 43. Embriones degenerados in vitro (A) e in vivo (B)



En la Figura 43, se observan embriones degenerados de los dos grupos en los cuales se puede observar blastómeros oscuros en desorden y sueltos. Tienen un aspecto que parece que se desintegraran lo cual se debe a la granulación o vacuolización de los blastómeros, algunos presentan forma asimétrica y presentaron un crecimiento retardado con respecto a los otros embriones de la colecta. No son congelables ni se deben transferir en fresco.

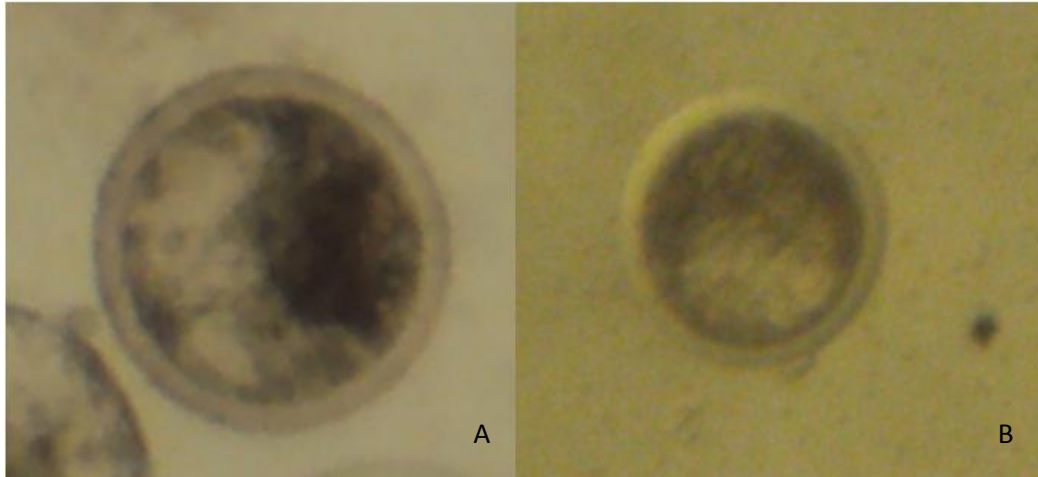
En cuanto a los embriones viables es decir los grado 1 y 2, vemos que se presentaron una gran cantidad de embriones grado 1 en el grupo in vitro (18 embriones) frente a los grado 1 del grupo in vivo. Se debe destacar que aunque fueron menor cantidad los embriones grado 1 del grupo in vivo, tan solo 3, su calidad evaluada morfológicamente fue superior y su estado fue más avanzado que los in vitro llegando al estado de blastocisto expandido y dos zonas pelúcidas solas lo que supone que pudieron ser blastocistos eclosionados en el interior de los oviductos ovinos.

Figura 44. Blastocitos expandidos Grado I de los dos grupos, in vitro (A) e in vivo (B.).



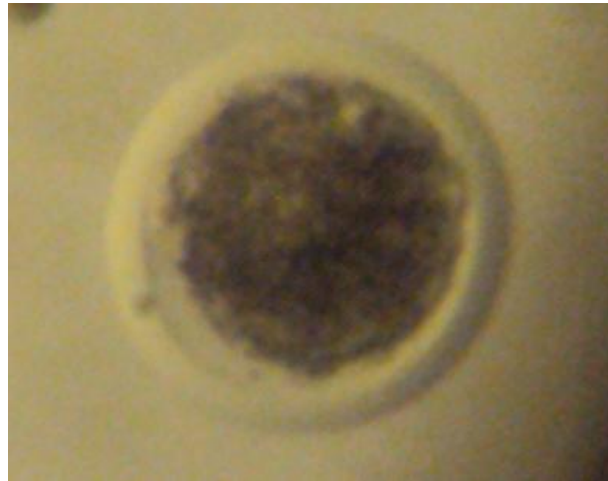
En la Figura 44, observamos dos blastocistos expandido, nótese que el diámetro aumenta hasta en un 150% y la zona pelucida se adelgaza hasta un 66% con respecto al grosor que tenía en el estadio de mórula. Son embriones esféricos, simétricos con células de tamaño, color y texturas uniformes. Puede haber pequeñas imperfecciones como algunos blastómeros sueltas, tamaño irregular o algunas vesículas. A pesar de que los dos embriones son grado 1 se ve como el embrión incubado en oviductos ovinos tiene una forma más esférica, su zona pelucida se encuentra más uniforme y pegada al embrión típico de un blastocisto expandido, además presenta un color más claro y uniforme. Estos embriones son los ideales para congelar.

Figura 45. Blastocistos compactos Grado 1 de los dos grupos in vitro (A) e in vivo (B).



En la Figura 45, se puede ver embriones en estadio de blastocisto compacto, nótese el espacio del blastocelo en ambos, especialmente delimitado en el embrión incubado in vivo. Se nota una zona pelucida de mayor tamaño que el blastocito expandido y una masa celular interna más compacta, sobre todo en el embrión incubado en las ovejas, también es de un color más claro y posee una zona pelucida libre de detritos celulares.

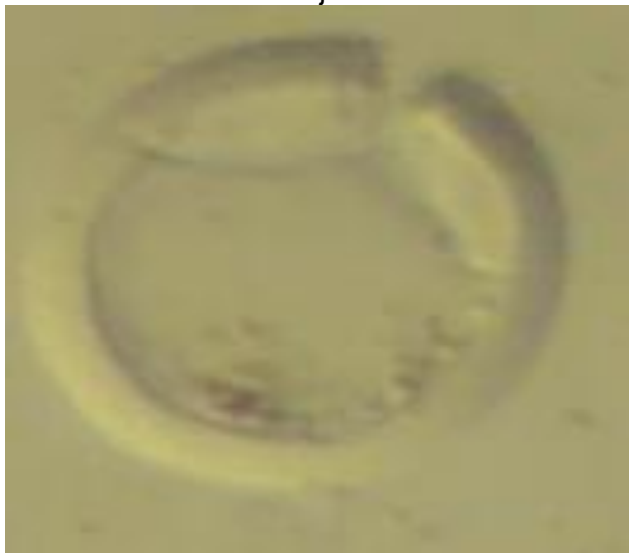
Figura 46. Mórula grado 2 incubada en oviductos ovinos.



En el estado de mórula ya no se puede distinguir el número de células y estas ocupan más del 60% del espacio perivitelino (Figura 46). Esta mórula Tiene algunos blastómeros sueltos, vesículas o células degeneradas y un color un poco oscuro, la zona pelucida tiene un aspecto bueno. Estos embriones son buenos para transferencias en fresco.



Figura 47. Zona pelucida Grado 2 recuperada de oviducto de una oveja.



La Figura 47 muestra una zona pelucida donde se evidencia la ruptura por donde eclosiono el embrión, muy probablemente es un embrión eclosionado del cual no fue posible recuperar la masa de células. Nótese la forma simétrica y claridad de la zona pelucida, lo que demuestra una calidad buena.

La morfología de los embriones in vitro generalmente aparece con diferencias frente a los embriones incubados in vivo, es decir son más oscuros, lo cual ha sido asociado con una gran acumulación de gránulos de lípidos en el citoplasma, los blastómeros se presentan más hinchados y el espacio perivitelino es menor en todas las etapas de los embriones producidos in vitro. Otros estudios mostraron que la expresión del gen 43 COMeXbl en la fase de blastocisto difiere entre los embriones de bovino producidos in vitro e in vivo, este gen está implicado en la formación de una proteína que le da lugar a uniones entre las células. Las uniones pobres se asocian con la formación de células con poca compactación lo que es común en los embriones producidos in vitro (Holm y Henrik, 1998).

Los embriones producidos in vivo poseen ciertas características estructurales que confieren ventajas sobre los producidos in vitro. Los embriones bovinos in vitro poseen menos microvellosidades y un menor cantidad de uniones intercelulares ocasionado por los espacios intercelulares. Una gran presentación de detritos celulares y un gran número de gotas de lípidos, mucho más que los producidos in vivo. Los embriones producidos in vitro mostraron menos cantidad de microvellosidades lo cual limita la superficie de absorción celular y podría traer implicaciones en la capacidad de transporte de la célula. Las mitocondrias de los embriones bovinos producidos in vitro se caracterizan por la presencia de un electrón luminoso en la matriz lo cual podría estar relacionados con problemas en la respiración celular, además los embriones in vitro bovinos contienen más detritos celulares en el espacio perivitelino y entre las células de la masa interna (Rizos, Fair y Papadopolus, 2002).

## CONCLUSIONES

Este estudio permitió confirmar que los ovarios de matadero utilizando la técnica de aspiración en el laboratorio son la manera más práctica de obtener oocitos, al aspirar 1052 oocitos de 74 ovarios, es decir 14.2 oocitos por ovario de los cuales 315 (30%) fueron destinados a la técnica de maduración in vitro.

De los oocitos aspirados se puede concluir que 315 fueron de suficiente calidad para destinarlos a maduración, los cuales estaban divididos en las siguientes calidades; 120 GI, 75 GII y 120 GIII.

Se concluyó que hay una relación directa entre la calidad del oocito posterior clivaje y calidad del embrión después de ser FIV, es decir a mayor calidad del oocito mayor probabilidad de fertilización y división exitosa.

Se observó como finalmente de los 315 oocitos destinados a MIV y FIV resultaron 214 embriones transferibles lo que equivale al 67,9% del total de estructuras fertilizadas.

Este estudio permite concluir que es posible y es una opción obtener embriones bovinos transferibles, congelables y en fases avanzadas como lo es un blastocisto eclosionado después de 6 días de incubación en oviductos ovinos.

La técnica de incubación in vivo de embriones bovinos en oviductos ovinos permite el desarrollo de embriones de altísima calidad.

El grupo de embriones producidos totalmente en el laboratorio alcanzo un número mayor de estructuras grado 1 frente a los embriones incubados in vivo, 18 (40%) y 3 (8.8%) respectivamente.

Los embriones incubados en oviductos ovinos alcanzaron mayor número de estructuras grado 2 que los producidos totalmente en el laboratorio, 3 (8.8%) y 1 (2.2%) respectivamente.

Se observó que en cuanto al desarrollo de las estructuras el grupo in vitro alcanzo un número mayor de blastocistos tempranos y blastocistos que el grupo in vivo, 23 (51%) y 3 (8.8%) respectivamente.

Dos embriones del grupo in vivo alcanzaron la fase más avanzada llegando hasta blastocisto eclosionado frente a los embriones producidos in vitro donde el máximo estado de desarrollo lo alcanzo 1 blastocisto expandido, esto al día 6 de incubación.

En los dos grupos de embriones el estado de desarrollo en el que más se encontraron embriones fue de 2 – 16 células, 28 embriones en este estado para el grupo In vivo y 17 para el grupo in vitro.

Aunque la cantidad de embriones grado 1 fue mayor para el grupo in vitro las estructuras grado 1 del grupo in vivo mostraron ciertas características como color, forma y compactación que morfológicamente los hacen de mayor calidad.

La cantidad de embriones degenerados que se obtuvieron al día 6 de incubación fue mayor para el grupo in vivo frente al grupo in vitro, 82.3% y 57.7% respectivamente.



## RECOMENDACIONES

- El material de matadero como los ovarios deben ser llevados lo más rápido posible al laboratorio para ser aspirados, intentado siempre mantenerse a una temperatura adecuada.
- Es importante contar con ovarios de sobra para la cantidad de embriones que se pretendan producir, pues algunos animales destinados al sacrificio tienen una actividad ovárica nula.
- Es aconsejable utilizar ovejas que al menos hayan dado cría una vez ya que así los órganos reproductivos son de mayor tamaño y hay más flexibilidad en los ligamentos con lo cual se puede exponer de manera adecuada el útero.
- Se debería contar con instrumentos idóneos para la implantación y la recolección de los embriones ya que debido al tamaño de las estructuras este procedimiento se dificulta y se termina afectando el porcentaje de recuperación embrionaria.
- Se debería contar con una cámara fotográfica especial para poder documentar las estructuras observadas en el microscopio ya que se torna difícil con una cámara convencional.
- Se recomienda futuras investigaciones para estandarizar una técnica que permita altos porcentajes de recuperación embrionaria.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Abe, H. y Matsuzaki, S. (2002). Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*, 57, 1273-1283.
- Aller, J., Alberio, R. y Palma, G. (2000). Gestación con embriones producidos in vitro a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. *Arch. med. vet.* 32(1), 36-39.
- Anguita, B. Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D., y Van Soom, A. (2007). Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology*, 67, 537-49.
- Anzaldúa, R., Arce, M., Cerbón, M. y Camacho, R. (2003). Ciencia. Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. *Veterinaria*, 4, 229-263.
- Besenfelder, U. y Havlicek, V. (2010). Endoscopic approaches to manage in vitro and in vivo embryo development: Use of the bovine oviduct. *Theriogenology* 73(6), 768-76.
- Bols, P., Van Soom, A., Ysebaert, M., Vandenneede, J. y de Kruif, A. (1996). Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45, 1001-1014.
- Bosch, P. (2000). *Desarrollo de embriones caprinos In Vitro: efecto del co-cultivo con células epiteliales de oviducto*. Departamento de Reproducción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.
- Brugo, S. (2010). *Inseminación Intrauterina*. Técnicas de reproducción asistida de baja complejidad. Disponible en: <http://www.seremas.com/?doc=procedimientos-inseminacion-intrauterina>
- Cabrera, P. y Fernandez, A. (2006). *Criopreservación de Embriones: una herramienta básica en la Reproducción Asistida*. Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Estado Aragua, Venezuela.
- Carrasco, L. (2007). *Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen, en el fluido oviductal de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral*. Tesis doctoral. Departamento de Fisiología. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Deleuze, S. y Goudet, G. (2009). Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. *Theriogenology*, 72, 203-209.
- De Loos, F., Maurck, T., Benden y Kruip, T. (1989). Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol. Reprod. Develop*, 31, 208-14.

De Loos F., Jeuken, Zeinstra, E. y Bevers, M. (1992). Structural aspects of bovine maturation in vitro. *Mol. Reprod. Develop*, 31, 208-214.

De Loos, F., Jeuken, M., Zeinstra, E. y Bevers, M. (1992). Follicular wall maintain meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. *Mol. Reprod. Develop*, 31, 208-214.

Enright, B.P. (2000). *Culture of In Vitro produced bovine zygotes In Vitro vs In Vivo: Implications for early embryo development and quality*. Department of Animal Science and Production, University College Dublin.

Eyestone, W.H. (1987). Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology*, 28, 1-7.

Feugang, J., Camargo, O. y Memili, E. (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, 121, 141-149.

Gandolfi, T. y Gandolfi, F. (2001). The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*, 55, 1255-1276.

Gibbons, A.E. (1995). *Transferencia de embriones en ovinos y caprinos* (pp. 32). INTA EEA Bariloche. Centro regional Patagonia norte. Área de investigación en producción animal. Grupo de reproducción y genética.

Gordon, I. (2004). *Tecnología de la Reproducción de los Animales de Granja* (pp. 493). Zaragoza, España: Acribia.

Hansen, P. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle—an overview. *Theriogenology*, 65, 119–25.

Hawk, H., Wall, R. (1994). Improved yields of bovine blastocyst from *in vitro*-produced oocytes I. Selection of oocytes and zigotes. *Theriogenology*, 41, 1571-1583.

Hernández, A., Nava, H. y Vílchez, V. (2009). Comparación de dos métodos de recolección de oocitos bovinos para maduración in vitro. 3(1), 41-44. Disponible en: [http://www.unesur.edu.ve/unidades/investigacion/descargas/Rev\\_Vol3\\_No1/SA\\_Hernandez-F\\_etal\\_2010.pdf](http://www.unesur.edu.ve/unidades/investigacion/descargas/Rev_Vol3_No1/SA_Hernandez-F_etal_2010.pdf)

Herradón, P.G, Quintela, L. A., Becerra, J. J., Ruibal, S. y Fernández, M. (2007). In vitro fertilization: An alternative for genetic improvement in bovines. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15(1), 33-40.

Holm, P. y Henrik, C. (1998). *In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application*. Embryo Technology Center, Danish Institute of Agricultural Sciences.

Izquierdo D. (2002). Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM–IVF oocytes. *Theriogenology*, 57, 1431-1441.

Jason, G., Seli, B. y Seli, E. (2008). Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 20, 234–241.

Khurana, N.K. y Niemann, H. (2000). Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morulablastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54, 741-766.

Lazzari, G. y Colleoni, S. (2010). Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology*, 73(6), 748-757.

Leibfried, L. Crttser, E.S., Parrish, J.J. y First, N.L. (1989). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31, 61-74.

Linder, G.M. y Wright, R.W. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20, 407-416.

Melling, M. y Alder, M. (2000). *Práctica Ovina y Caprina* (pp. 193). Buenos Aires, Argentina: Intermédica.

Merton, JS., de Roos AP., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, PL. y Dieleman, SJ. (2003) Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59, 651–74.

Nagano, M., Takahashi, Y. y Katagiri, S. (1999). In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocyte having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 531–535.

Palma, G., y Brem, G. (2001). *Biotechnología de la Reproducción* (2da ed.) (pp. 125-132). Buenos Aires, Argentina: Reprobiootec.

Palma, GA. (2008). *Biotechnología de la Reproducción* (2<sup>da</sup> ed.) (pp. 237- 240). Buenos Aires, Argentina: Reprobiootec.

Papadopoulos, S. (2002). Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*, 35-44.

Parra, G. (2007). *Vitrificación de Embriones en Ovinos de Pelo*. Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Mendoza, Argentina.

Pavlok, A. Lucas-Hanhn, A. Nienian, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod.* 31, 61-67.

Peña, M., Góngora, A. y Estrada, J. (2007). Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. *Rev.MVZ Cordoba*, 12(1), 942-954.

Pomar, F.J., Teerds, A. y Kidson, K.J. (2000). Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study, *Theriogenology*, 2254-2268.

Prather, R.S. y Sims, M.M. (1991). Culture of porcine embryos from the one- and two-cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. *Theriogenology*. 1147-1151.

Pontes, J., Nonato-Junior, I., Sanches, B., Ereno-Junior, J., Uvo, S., Barreiros, T., Oliveira, J., Hasler, J. y Seneda, M. (2008). *Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. Theriogenology*, 71(4), 690-697.

Revelli, A., Delle, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M. y Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 40. doi: 10.1186/1477-7827-7-40.

Rizos, D, Duffy, P., Boland, M., y Lonergan, P. (2002). Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development *in Vitro* versus *In Vivo*: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. *Molecular reproduction and development*, 61, 234-248.

Rizos, D., Fair, T. y Papadopolus, S. (2002). Developmental, Qualitative, and Ultrastructural Differences Between Ovine and Bovine Embryos Produced In Vivo or In Vitro. *Molecular reproduction and development*, 62, 320-327.

Robl, J. y Prather, R. (1987). Nuclear transplanted in bovine embryos, *J Anim Sci*, 64, 642-647.

Rodriguez, N., Cognie, Y., Gonzalez, F., Poulin, N., Guignot, F., Touze, J., Baril, G., Cabrera, F., Alamo, D., Batista, M., Gracias, A. y Mermillod, P. (2007). Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, 68, 908-913.

Rubio, F., Teerds, A., Kidson K., Colenbrander, B., Tharasanit, T., Aguilar, B. y Roelen, B. (2005). Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, 2254-2268.

Singh, R. y Sinclair, K. (2007). Metabolomics: Approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology*, 68S, S56-S62.

Sisson, S. y Grossman, J.D. (1982). *Anatomía de los Animales Domésticos* (5ª ed.) (pp. 1049–1058). México: Salvat.

Salas, E. y Gallegos, A. (2006). *Manual de Laboratorio de Reproducción Animal*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

Schiewe, M., Howard, I., Goodrowe, K., Stuart, L. y Wildt, D. (1990). Human menopausal gonadotrofin (hCG) induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F2a synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology*, 34:469-486

Sirard, M.A, y Blondin, P. (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*, 42, 417- 426.

Sirard, M.A. (2001). Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 55, 1241–54.

SÜSS. (1987). *Characterisation of in vitro matured and fertilized bovine oocytes*. Symposium on biotechnology in animal breeding. Japanese-German Centre, Berlin.

Tamassia, M., Nuttinck, F., May-Panloup, P., Reynier, P., Heyman, Y., Charpigny, G., Stojkovic, M., Hiendleder, S., Renard, JP. y Chastant-Maillard, S. (2004). In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod*, 71, 697-704.

Tovío, N., Duica, A., Grajales, H. (2008). Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas de trasplante de embriones bovinos. *Rev. MVZ Córdoba*, 13(1), 1240-1251.

Ugalde, R., Folch, J. Cocero, MJ., Fernández, A., Alabart, J. y Garbayo, J. (1998). Transferencia de embriones en ovejas receptoras tratadas con hormona de crecimiento, efectos sobre la viabilidad de los embriones. *Vet. Méx*, 29(2), 137-45

Wetscher F. (2005). Effect of morphological properties of transferred embryonic stages on tubal migration: Implications for in vivo culture in the bovine oviduct. *Theriogenology*, 41-48.

Wetscher, F. y Havlicek V. (2005). Effect of morphological properties of transferred embryonic stages on tubal migration: Implications for in vivo culture in the bovine oviduct. *Theriogenology*, 64, 41-48.

Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, JW. y Niemann, H. (1996). Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil*, 108, 17 - 24.

Wright, R. y Ellington, J. (1995). Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology*, 44, 1167-1189.

Yanagimachi, R. (1988). Mammalian Fertilization en: Knobil, E. y Neill, J. (Eds.) *The physiology of Reproduction* (pp.135-186). New York: Rayen Press.

## ANEXOS

## ANEXO 1

Tabla de calidades oocitos recolectados

NO. OVARIOS	GI	GII	GIII	S/C	EXP	ATR	DE G	TOTAL OOCITOS NO MIV	TOTAL OOCITOS MIV	TOTAL
<b>74</b>	120	75	120	372	113	178	74	737	315	<b>1052</b>
	11.4 %	7.1 %	11.4 %	35.3 %	10.7 %	16.9 %	7%	70.1 %	29.9%	

## ANEXO 2

Tabla de Chi Cuadrado para clivados y no clivados.

VARIABLE	O	E	(O-E) E	
CALIDAD I CLIVADOS	93	71,33	6,58	
CALIDAD I NO CLIVADOS	12	33,66	13,94	
CALIDAD II CLIVADOS	70	71,33	0,02	
CALIDAD II NO CLIVADOS	35	33,66	0,05	
CALIDAD III CLIVADOS	51	71,33	5,79	
CALIDAD III NO CLIVADOS	54	33,66	12,29	<b>CHI t</b>
	315	314,97	<b>38,68</b>	<b>5,991</b>

Tabla de Chi Cuadrado para calidad in vitro vs ovejas

VARIABLE	O	E	(O-E) E	
LABORATORIO CALIDAD I	18	11,96	3,05	
LABORATORIO CALIDAD II	1	2,27	0,71	
LABORATORIO CALIDAD III	26	30,75	0,73	
OVEJA NO. 1 CALIDAD I	0	0	0,00	
OVEJA NO. 1 CALIDAD II	0	0	0,00	
OVEJA NO. 1 CALIDAD III	0	0	0,00	
OVEJA NO. 2 CALIDAD I	0	3,98	3,98	
OVEJA NO. 2 CALIDAD II	1	0,75	0,08	
OVEJA NO. 2 CALIDAD III	14	10,25	1,37	
OVEJA NO. 3 CALIDAD I	0	0,26	0,26	
OVEJA NO. 3 CALIDAD II	0	0,05	0,05	
OVEJA NO. 3 CALIDAD III	1	0,68	0,15	
OVEJA NO. 4 CALIDAD I	3	4,79	0,67	
OVEJA NO. 4 CALIDAD II	2	0,91	1,31	
OVEJA NO. 4 CALIDAD III	13	12,3	0,04	<b>CHI t</b>
	79	78,95	<b>12,40</b>	<b>15,507</b>



Tabla de Chi Cuadrado para in vitro vs in vivo

VARIABLE	O	E	(O-E) E	
IN VITRO CALIDAD I	18	11,96	3,05	
IN VITRO CALIDAD II	1	2,27	0,71	
IN VITRO DEGENERADOS	26	30,76	0,74	
IN VIVO CALIDAD I	3	9,03	4,03	
IN VIVO CALIDAD II	3	1,72	0,95	
IN VIVO DEGENERADOS	28	23,24	0,97	<b>CHI t</b>
	79	78,98	10,45	<b>5,991</b>

**ANEXO 3****Tabla de porcentaje de clivaje según el grado de calidad oocitario**

<b>Porcentaje de clivaje</b>		
<b>GI</b>	<b>GII</b>	<b>GII</b>
<b>88,50%</b>	<b>66%</b>	<b>49%</b>

**ANEXO 4****Tabla de cantidad de oocitos que clivaron y no clivaron**

	<b>CLIVARON</b>	<b>NO CLIVARON</b>	<b>TOTAL</b>
<b>CALIDAD I</b>	93	12	<b>105</b>
<b>CALIDAD II</b>	70	35	<b>105</b>
<b>CALIDAD III</b>	51	54	<b>105</b>
<b>TOTAL</b>	<b>214</b>	<b>101</b>	<b>315</b>

**ANEXO 5****Tabla de calidades de embriones recuperados**

<b>Grupos</b>	<b>Implantados</b>	<b>Recuperados</b>
<b>in vitro</b>	46	45
<b>oveja 1</b>	42	0
<b>oveja 2</b>	42	15
<b>oveja 3</b>	42	1
<b>oveja 4</b>	42	18

**ANEXO 6****Tabla de recuperación embrionaria en los diferentes grupos**

	<b>CALIDAD I</b>	<b>CALIDAD II</b>	<b>CALIDAD III</b>	<b>TOTAL</b>
<b>LABORATORIO</b>	18	1	26	<b>45</b>
<b>OVEJA NO. 1</b>	0	0	0	<b>0</b>
<b>OVEJA NO. 2</b>	0	1	14	<b>15</b>
<b>OVEJA NO. 3</b>	0	0	1	<b>1</b>
<b>OVEJA NO. 4</b>	3	2	13	<b>18</b>
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>4</b>	<b>54</b>	<b>79</b>