

PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.

RESUMEN

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

Palabras clave. Embrión, maduración, fertilización, cultivo, criopreservación, transferencia.



INDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCION	5
	OBJETIVOS	6
II.	RESEÑA HISTORICA	7
III.	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PIV	10
1.	PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.	12
1.1	Métodos empleados para la obtención de ovocitos	12
1.1.1	Recolección y transporte de ovarios desde el matadero	12
1.1.2	Técnica de aspiración folicular	13
1.2	Sistemas de producción in vitro	20
1.2.1	Maduración de ovocitos	21
1.2.2	Fecundación de ovocitos	23
1.2.3	Cultivo de embriones	25
1.3	Componentes de los medios de cultivo	28
1.3.1	Parámetros biofísicos y elementos orgánicos	28
1.3.2	Compuestos orgánicos	30
2.	CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS	36
2.1	Congelación	37
2.2	Vitrificación	45
3.	EVALUACION DE EMBRIONES BOVINOS	49
3.1	Clasificación embrionaria	49
3.1.1	Estadio de desarrollo embrionario	49
3.1.2	Calidad embrionaria	51





4. PROTOCOLO DE LA PIV	52
4.1 Metodología para la obtención y maduración de ovocitos	53
4.2 Metodología de fecundación in vitro de embriones bovinos	59
4.3 Metodología para el cultivo in vitro de embriones bovinos	67
4.4 Descongelación	72
4.5 Transferencia	74
IV. CONCLUSIONES	76
V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
VI. ANEXOS	80





UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES
BOVINOS”**

*Monografía previa a la
obtención del título de Médico
Veterinario y Zootecnista.*

AUTOR: Verónica Alejandra Peláez Peláez.

TUTOR: Dr. Carlos Soria Parra.

CUENCA – ECUADOR

2011



I. INTRODUCCION.

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

La última década del siglo pasado, se caracterizó por ser un período relevante, para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. Así mismo, en los actuales momentos vivimos la era de la clonación y la transgénesis, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas

Un objetivo valioso del desarrollo de la biotecnología, es la producción *in vitro* de embriones bovinos, como base para otras investigaciones cuando son transferidos a hembras receptoras, obteniéndose el nacimiento de crías saludables.

El presente trabajo es una selección de información que busca despertar el interés sobre esta técnica, adquirir conocimientos y socializar para que en el futuro se difundan ampliamente y se aplique como una herramienta de mejora genética.



OBJETIVOS.

1. Objetivo General.

- El objetivo general de esta monografía es conocer y difundir la técnica de Producción In Vitro de Embriones Bovinos, buscando que el receptor entienda el proceso y adquiera interés por el área de la investigación.

2. Objetivos Específicos.

- Conocer la técnica a usarse para obtener embriones bovinos.
- Trabajar con los principales medios de cultivo para la producción in vitro de embriones.
- Establecer los métodos de criopreservación de embriones bovinos y su transferencia.



II. RESEÑA HISTORICA.

“Desde hace más de un siglo, fue observado por primera vez, la fertilización de un huevo de estrellas de mar con la consecuente formación de la primera célula del embrión. Invertebrados marinos han sido objeto de la investigación antes de tiempo porque, a diferencia de los mamíferos, la fecundación se produce externamente al sistema reproductivo femenino.

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

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

Por último, en los años 50, Wesley Whitten propuso una nueva formulación de los medios de cultivo, que se utiliza tanto en la recolección y el cultivo de embriones, aumentando significativamente el número de embriones implantados con éxito. Whitten ha desarrollado un medio con un bicarbonato de Krebs-Ringer, suplementado con albúmina de suero bovino, que fue capaz de promover la división de un embrión de ratón con una célula a la fase de blastocisto. Junto con Whitten, Ralph Brinster comenzó una línea de investigación para determinar las necesidades nutricionales de un embrión en la cultura y durante el



proceso, desarrolló la técnica de cultivo de embriones en microgotas se utilizan actualmente en varios laboratorios en el mundo, tanto en animales y humanos.

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

reportó el nacimiento del primer mamífero (conejo) generado a partir de esta técnica. Desde entonces y hasta finales de los 70, varios otros informes que siguió a la toma de nacimientos de crías saludables FIV se registraron. Tras el informe de Chang (1959), Whittingham, en 1968, trabajando con éxito con ratones, y algunos años más tarde Toyoda y Chang estableció la FIV a las ratas. Steptoe y Edwards (1978) estableció un nuevo hito en la historia de la fecundación in vitro en el mundo con el nacimiento con éxito del primer bebé humano.

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

En 1971, Crosby y su equipo han producido crías sanas de las ovejas, el mismo año Leman y Dziuk han tenido éxito trabajando con cerdos, un resultado que fue demostrado en 1974 por Fulco y Motlik. El primer informe de la producción de un ternero con la técnica descrita anteriormente se produjo en 1970, y se llevó a cabo por Sreenan y su personal.



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

Sin embargo, incluso con las pruebas presentadas por Blandau (1980) a principios de los años 80 se produjo finalmente un becerro de la FIV. Brackett y col. (1982) fueron los primeros en publicar el nacimiento de un ternero saludable, lo cual ocurrió el 9 de junio de 1981, producido por FIV. En su obra se utilizaron 22 donantes y 7 receptoras, para la fertilización se utilizó tanto semen fresco y las muestras congeladas. Las muestras de semen de los animales fueron pre seleccionados para la inseminación artificial, lo que indica una buena calidad de

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

La primera ternera FIV nació pesando 45 kg y después de unos meses de observaciones, no se observaron cambios en el desarrollo y el comportamiento del animal. Desde entonces, el ganado PIV recibió un gran impulso, ya que se comprobó que podía ser plenamente viable en condiciones artificiales.” (7)



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

- **Ventajas.**

- “Evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos.
- Difusión del uso de semen valioso y escaso.
- Prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos.
- Creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados por excelencia productiva y/o adaptabilidad.
- Determinación y selección del sexo de embriones.
- Control de enfermedades de la esfera reproductiva.
- Aplicación de la transferencia de embriones en especies exóticas y en peligro de extinción” (5)
- Permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas (tuberculosis, brucelosis, leucosis).
- Permite el aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad: machos con



oligospermias severas, hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital.” (9)

- **Desventajas.**

- “Bajo rendimiento, el porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra estancado entre el 30 y 40%.
- Los embriones producidos in vitro son de menor calidad que los obtenidos in vivo.
- Reducción del potencial de desarrollo pre y postimplantacional, ocasionando bajos porcentajes de gestación (30 a 40%).
- Existe una escasa resistencia a la Criopreservación, dificultando su conservación a largo plazo.
- Incremento de la mortalidad embrionaria, abortos, problemas gestacionales como el hidroalantoides y alargamiento de la gestación.
- Nacimiento de terneros muy voluminosos, con anomalías estructurales y funcionales, conocido con el nombre de síndrome de exceso de volumen fetal, que disminuyen el vigor de los animales en el momento de su nacimiento y provocan una mayor mortalidad peri natal.
- Incremento del porcentaje de distocias por exceso de volumen fetal.” (9)



1. PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.

1.1. Métodos empleados para la recolección de ovocitos.

1.1.1. Recolección y transporte de los ovarios desde el matadero.

Se realiza a partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm. (9)

Esta técnica suministra una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo, provenientes de animales en diferentes estados de ciclo estral, que pueden ser madurados, criopreservados, fertilizados y cultivados in vitro hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario. (10)

También es útil para un último aprovechamiento de hembras sacrificadas por motivos sanitarios, accidentes o reposición. (3)

Los embriones se producen a partir de óvulos (ovocitos) recuperados de ovarios provenientes de animales que se envían a faena o vacas castrada, por cada vaca (2 ovarios recuperados) se pueden obtener entre 15-20 óvulos lo que permitirá obtener 4-6 óvulos para transferir.(11)

Los ovocitos son en general obtenidos en el matadero a partir de ovarios de vacas y vaquillonas no preñadas



aunque hasta el momento no existe evidencia que la producción de ovocitos a partir de ovarios con un CL de gestación sea diferente. Los ovarios contienen un gran número de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo. El transporte de los ovarios se lleva a cabo en un termo que contiene una solución PBS o en una solución salina a temperatura ambiente pudiéndose conservar entre 20-25 °C durante 6-7 horas sin que afecte la capacidad de desarrollo posterior. En el laboratorio los ovocitos son obtenidos junto a su líquido folicular. (6)

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

En la actualidad, la recuperación de ovocitos de hembras vivas por punción transvaginal guiada ecográficamente (Ovum Pick-Up; OPU) (fotografía 1) y su posterior maduración, fecundación y cultivo in vitro permite la producción de embriones que pueden ser criopreservados o bien transferidos a hembras receptoras. (3)



Fotografía 1. Folículos localizados ecográficamente.
(Fuente. Ruiz LS.)

Esta técnica permite recoger ovocitos en las hembras de más de seis meses de edad, durante los primeros tres meses de gestación y a partir de las 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos



productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de seis meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia.
(9)

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

La aspiración transvaginal guiada por ultrasonido es la técnica de recolección de ovocitos de hembras vivas usada regularmente. La aspiración folicular puede ser repetida en el mismo animal durante 5-6 meses y una periodicidad de dos aspiraciones por semana o una semanal, sin ningún efecto sobre la reproducción o el bienestar animal.

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



obtenidos por lavado, obteniéndose porcentajes de preñez que varían desde un 25-45 %.” (10)

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

1. La OPU precisa de la tranquilización previa del animal, esta se llevara a cabo con el animal en pie en un potro de contención (fotografía 2), mediante xilacina (i.m.) al 2%.



Fotografía 2. Potro de contención.
(Fuente. Serizier. A)

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



Fotografía 3. Anestesia epidural.
(Fuente. Serizier. A)

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





Fotografía 4. Asepsia del área de trabajo.
(Fuente. Serizier. A)

4. Se introducirá el transductor en la vagina (fotografía 5), convenientemente lubricado y protegido por una cubierta sanitaria de látex.



Fotografía 5. Introducción del transductor. Sujeción del ovario (mano izquierda) y manejo del mango de OPU (mano derecha).
(Fuente. Serizier. A)

Para la visualización de los folículos ováricos empleamos un ecógrafo equipado con una sonda transvaginal de 5-7'5 MHz y un "handgrip" o mango de OPU de 60 cm de longitud donde se colocara la guía de punción. Por la guía se introducirá una aguja de punción desechable (20 G, 0'9 x 70mm) conectada a un tubo estéril de 50 ml mediante una conducción de Teflón. El equipo de OPU se completa con una bomba de vacío accionada por pedal con la que se aplicara una aspiración constante de 50-53 mm Hg (20 ml/min).



El tubo de recogida debe mantenerse atemperado a 37°C en baño termostático (grafico 1).



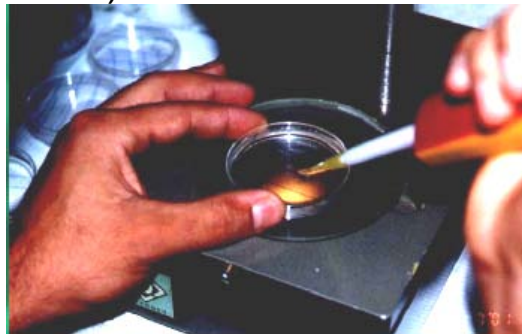
Grafico 1. SISTEMA DE OPU. Pieterse e col. 1988.
(Fuente. Serizier. A)

5. Los ovarios se posicionaran vía rectal delante de la sonda para ováricos visibles de más de 3 mm de diámetro. Antes de iniciar la sesión de punción se drenara el sistema aspirando una pequeña cantidad de medio de recogida. Tras la aspiración de cada 3-4 folículos se realizara un lavado exhaustivo del fluido folicular en la aguja de aspiración y en el sistema de recolección con medio de lavado y recogida [PBS suplementado con heparina sódica (2'2 UI/ml) y suero fetal bovino (1%)].
6. El fluido obtenido de cada animal contenido en un tubo de recogida de 50 ml será inmediatamente filtrado (fotografía 6), los restos de sangre serán eliminados por continuos lavados en PBS fresco y se pasara a una placa de Petri para localizar y evaluar morfológicamente bajo estereomicroscopio los complejos cumulus ovocito (COCs) aspirados (fotografía 7).” (16)





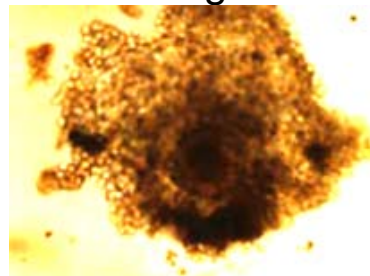
Fotografía 6. Fluido obtenido filtrándose.
(Fuente. Serizier. A)



Fotografía 7. Búsqueda y clasificación de los óvulos.
(Fuente. Serizier. A)

“Clasificaremos los COCs obtenidos en cinco categorías, según homogeneidad, morfología del citoplasma y compactibilidad de las células del cumulo:

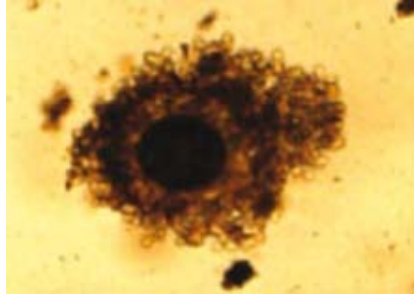
- **Categoría I:** Ovocitos con más de tres capas de células de cumulo compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granuloso (fotografía 8).



Fotografía 8. Ovocitos rodeados de 6 capas de células del cúmulo.
(Fuente. Fernández A, Díaz T, Muñoz G)



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



Fotografía 9. Ovócitos rodeados de 2 capas de células de cumulus.

(Fuente. Fernández A, Díaz T, Muñoz G)

- **Categoría III:** Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras (grafico 2).

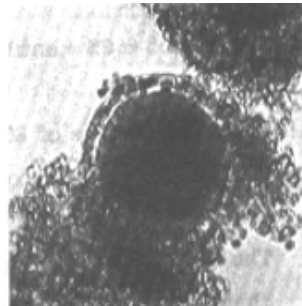
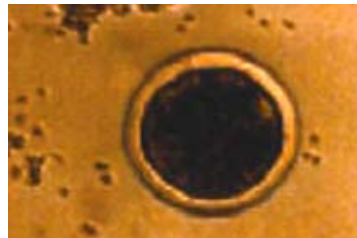


Grafico 2. Ovocitos con pocas células de *cumulus*.

(Fuente. Filipiak Y, Larocca C.)

- **Categoría IV:** Ovocitos desnudos (fotografía 10).



Fotografía 10. Ovocitos desnudos.

(Fuente. Fernández A, Díaz T, Muñoz G)

- **Categoría V:** Ovocitos madurados in vivo, con cumulo expandido.

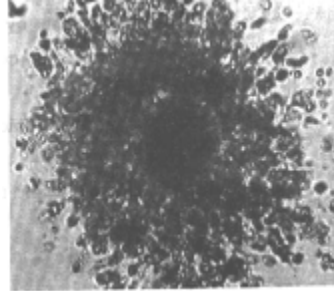


Grafico 3. Ovocito con cumulus expandido. Después de 24h de la maduración.
(Fuente. Filipiak Y, Larocca C.)” (16)

1.2. Sistemas de producción in vitro de embriones.

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

- Maduración de ovocitos
- Fecundación de ovocitos maduros
- Cultivo de embriones.(grafico 4)

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

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



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

Esto indica que el cultivo embrionario, correspondiente al paso más prolongado dentro del proceso de producción in vitro, es el período en el que se establece el mayor porcentaje de pérdidas del sistema. A su vez, durante esta etapa, se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos.” (4)

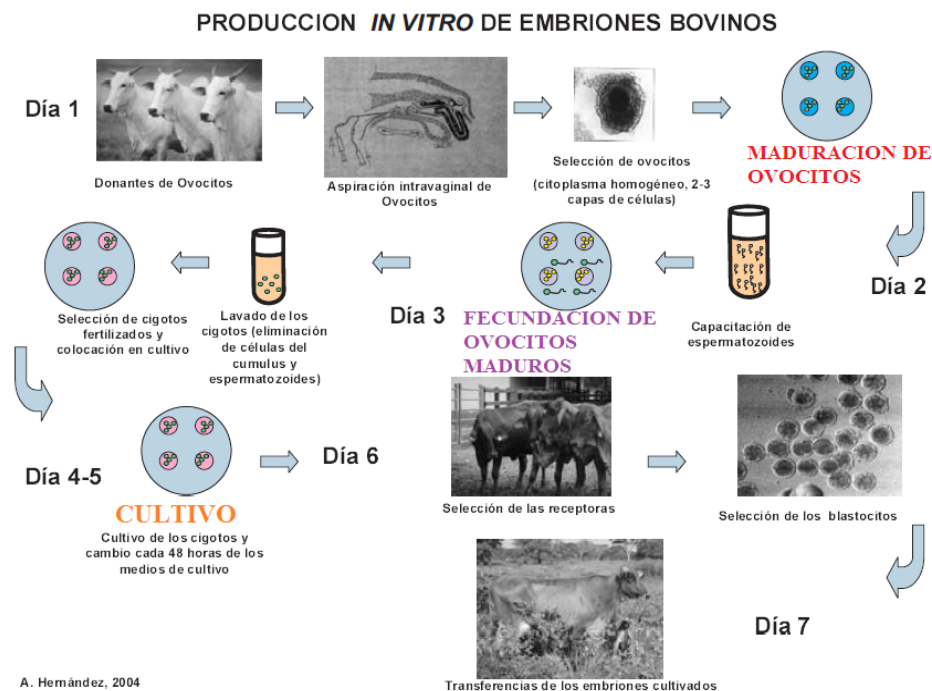


Grafico 4. Esquema de la PIV.
(Fuente. F. Hernández H.)

1.2.1 Maduración de ovocitos.

“La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo, durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de profase de MI hasta el de MII (maduración



nuclear). El ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de LH, o bien, cuando es retirado del folículo para llevar a cabo la maduración in vitro. Un periodo de 24h es necesario para que el ovocito bovino complete la maduración nuclear, es decir, alcance el estadio de MII, en el que permanece hasta el momento en que es fertilizado, que es cuando completa la meiosis y se forma los pronúcleos.

Además de la maduración nuclear, también es importante que exista una maduración citoplasmática ya que prepara al ovocito para soportar la fertilización y aportar los nutrientes requeridos para el desarrollo embrionario temprano. De manera natural, la meiosis inicia en el ovario fetal, pero se detiene antes del nacimiento, en la profase (PI) de la primera división meiotica; los ovocitos pasan entonces a la etapa reticulada, que es un estado de reposo nuclear y que suele durar hasta que se ovula el primer ovocito en la pubertad. Los ovocitos en reposo o inmaduros tienen un gran nucleo denominado vesícula germinal. La meiosis avanza desde la etapa de vesícula germinal o PI hasta la metafase de la segunda división meiotica en la que se detiene una vez mas, dando como resultado un primer cuerpo polar que es expulsado al espacio perivitelino. De la misma manera en la que madura el nucleo se debe llevar a cabo la maduración del citoplasma.” (20)

”En los últimos tiempos se a podido demostrar que la adquisición de capacidad para desarrollar es un proceso que comienza mucho antes del periodo periovulatorio, antes de la ruptura de la vesícula germinal. En este sentido se a demostrado que ovocitos contenidos en folículos antrales de mas de 5-6



mm presentan una mayor capacidad para desarrollar respecto a aquellos contenidos en folículos de menor diámetro.

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

Cuando los ovocitos son aspirados desde los folículos terciarios reanudan espontáneamente la meiosis y al ser cultivados in vitro continúan con los procesos de maduración. De este modo la composición de los medios y el ambiente controlado por estufas de cultivo, deben brindar un ambiente adecuado para que la maduración ocurra en 24hs de un modo similar a lo que sucede in vivo durante más de dos ciclos estrales en el bovino. Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios para lograr este ambiente, involucra el uso de medios de cultivo tales como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc), antioxidantes (glutatión, cisteamina, cistina), factores de crecimiento y macromoléculas (suero, albumina), en una atmósfera de 5% CO₂ a 38,5°C y humedad a saturación.” (12)

1.2.2 Fecundación de los ovocitos.

Consiste en incubar los óvulos madurados (producto de la fase anterior) con espermatozoides vivos y móviles durante un periodo de 6 a 24 horas, luego de un proceso de selección y capacitación



espermática que nos permitirá a su vez deshacernos de componentes del plasma seminal, crioprotectores y espermatozoides muertos o con escasa vitalidad. La capacitación espermática generalmente se logra exponiendo los espermatozoides vivos a concentraciones de heparina y cafeína, entre otras. Estas sustancias logran estimular el proceso de capacitación del espermatozoide que lo prepara para interaccionar y fecundar el óvulo. (8)

Una vez que disponemos de ovocitos maduros, el siguiente objetivo es lograr la fecundación de los mismos, para ello se incuban junto con espermatozoides capacitados en un medio suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y albúmina sérica. En la especie bovina, la capacitación espermática se ve favorecida por la incorporación de heparina al medio. No obstante, para lograr unos resultados óptimos es necesario ajustar la concentración de heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado concreto. (11)

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

Con el fin de lograr los procesos de capacitación, reacción del acrosoma y pasaje a través de las barreras ovocitarias, el semen debe ser tratado rápidamente antes de cocultivar los espermatozoides con los ovocitos. Este tratamiento incluye la eliminación de todos los elementos presentes (plasma seminal,



componentes del diluyente en caso de semen congelado-descongelado, contaminantes, etc) excepto los espermatozoides y una selección de los espermatozoides vivos y con motilidad progresiva.

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

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

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

Por último se efectúa la dilución y el conteo de los espermatozoides móviles para alcanzar habitualmente una dosis inseminante de 1-6 millones de espermatozoides por ml de medio de fecundación dependiendo del protocolo utilizado.” (12)

1.2.3 Cultivo de embriones.

Aquellos embriones de 4 o más células resultantes de la FIV son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo embrionario donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta



llegar a mórulas y blastocistos. Al llegar a estos estadios, los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras (en fresco) o congelados para su posterior uso. Durante esta etapa destacan la presencia en el medio de cultivo de diversas fuentes de energía como la glucosa y aminoácidos esenciales y no esenciales. (8)

Los medios utilizados para el cultivo de los embriones bovinos han sido clasificados en tres categorías: **indefinidos**, cuando se utiliza suero y cocultivo con células somáticas; **semidefinidos**, cuando se omite el cocultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica; y **definidos**, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona. (11)

Luego de la maduración in vitro, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar. De estos aproximadamente el 80% son fecundados y comienzan a dividir, al menos, hasta el estadio de 2-4 células. Sin embargo solo un 25-40% alcanzan el estadio de blastocisto o blastocisto expandido. El cultivo embrionario corresponde al paso más prolongado dentro del proceso, es el periodo que determina la eficiencia global del sistema así como la calidad de los embriones obtenidos. (12)

Los primeros intentos de cultivar embriones bovinos in vitro se toparon con la dificultad de que los embriones no superaban la etapa de 8 a 16 células, situación denominada “bloqueo del desarrollo” que no implicaba la muerte inmediata del embrión, pero que era irreversible. Para evitar este bloqueo se utilizó el



cocultivo con células somáticas o los medios condicionados por dichas células y se suplementaron con suero. Sin embargo, con el tiempo se demostró que la aplicación de estos procedimientos de cultivo generaba diversos inconvenientes. En primer lugar, esta metodología, que implicaba la utilización de medios indefinidos, dificulta notablemente el conocimiento de las necesidades de los embriones durante sus etapas de desarrollo temprano. Además, estas condiciones suponen un elevado riesgo de incorporar patógenos durante el cultivo. Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la incorporación de suero al medio de cultivo es uno de los principales factores responsables de la presentación del síndrome de exceso de volumen fetal y de la baja resistencia a la criopreservación de los embriones obtenidos. (9)

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

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

Co-cultivo.- involucra la asociación de los cigotos con otro tipo de células en el medio de cultivo. Para esto se utiliza células somáticas tales como las células de la granulosa u oviductales, que al desarrollar puede producir y liberar factores de crecimiento, hormonas, etc, que podría favorecer el desarrollo embrionario



temprano. Se ha propuesto que las células somáticas podrían remover sustancias tóxicas o disminuir la tensión de oxígeno en el microambiente que rodea al embrión. Actualmente los cultivos se realizan en estufas que controlan el CO₂ y el O₂ para lograr un ambiente con presiones parciales entre 40-60 mmHg, las cuales son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas.

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

Secuenciales o no secuenciales.- los no secuenciales son aquellos sobre los cuales no se efectúa modificaciones a lo largo del cultivo, mientras que los secuenciales son aquellos en los cuales la composición va siendo modificada, mediante la adición de sustancias o el recambio del medio en función de los requerimientos o para eliminar productos del metabolismo embrionario que podría afectar su viabilidad.” (12)

1.3. Componentes de los medios de cultivo.

1.3.1. Parámetros biofísicos y elementos inorgánicos.

“Varios autores coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes



a controlar en los medios de cultivo embrionario son los siguientes:

- **Osmolaridad.** Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/Kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario.
- **PH.** La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados in vitro desarrollan un pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7,2 y 7,6.
- **CO₂ y O₂.** La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO₂ en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas.
- **El fluido oviductal.** Bovino y ovino se caracteriza por bajos niveles de Na y altos niveles de K, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos.
- **El agua** es el componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario. Las fuentes de agua utilizadas han sido el agua de lluvia, la obtenida por sucesivas destilaciones o actualmente la



producida por sistemas de purificación que utilizan el principio de ósmosis reversa. En estos últimos equipos, el grado de pureza del agua puede ser controlado mediante la determinación de su resistencia al paso de la corriente eléctrica (cuanto mayor sea esta, mayor será su pureza). La mayor resistencia ofrecida es 18,3 megaohms-cm a 25°C.” (5)

En todos los casos no se recomienda almacenar por largos periodos el agua que va a ser utilizada en medios de cultivo debido a la contaminación con metales pesados liberados desde los envases de plástico o vidrio. (13)

1.3.2. Compuestos Orgánicos.

Actualmente, existe una gran cantidad de información, no siempre coincidente, referida al efecto de ciertas hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares, sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, dos componentes son constantes en las formulaciones finales de los medios de cultivo utilizados corrientemente en la producción in vitro de embriones. Estos son: (4)

Fuente de energía.

“Las fuentes de energía más utilizadas en los medios de cultivo de embriones son, en general, el lactato, el piruvato y la glucosa.

Se ha demostrado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo.



La falta de utilización de la glucosa durante los primeros estadios estaría dada por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa. Esta enzima acelera la glucólisis catalizando la formación de fructosa 1-6 bifosfato a partir de fructosa 6 fosfato, y se encuentra controlada alostéricamente por el cociente ATP-ADP, particularmente alto en este período. En esta etapa, la adición de glucosa a los medios de cultivos no solamente no sería aprovechada, sino que, a su vez, generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, en embriones bovinos a partir del estadio de 8-16 células y en respuesta a una alta demanda de energía necesaria para la compactación, y la formación y expansión del blastocelo, el cociente ATP-ADP podría disminuir, y con ello, la inhibición ejercida sobre la enzima mencionada, con lo cual aumentaría el consumo de glucosa. Este metabolito también participa en la síntesis de precursores de ácidos nucleicos y de lípidos y su disponibilidad sería importante durante la eclosión fuera de la zona pelúcida.

Con respecto a los lípidos, poco se sabe acerca de la importancia que tendrían en la producción de energía durante el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, en los últimos años se ha debatido la posibilidad de mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados a través de la adición de ciertos componentes lipídicos a los medios de cultivo, específicamente ácido linoleico no como fuente energética, sino como fluidificador de las membranas plasmáticas.” (4)



Fuente de proteína.

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

Se ha demostrado que los aminoácidos no esenciales favorecerían el desarrollo en estadios tempranos, mientras que los esenciales harían lo mismo en embriones de más de ocho células. Este cambio en la utilización de aminoácidos, pareciera deberse a requerimientos específicos de las células embrionarias, en donde las células trofoblásticas, que dan origen a la placenta fetal, utilizarían aminoácidos no esenciales y glutamina, mientras que las de la masa celular interna, que originan al feto, tendrían preferencia por los esenciales.” (4)

“Suplementación proteica.- Usualmente se agrega suero bovino y/o albúmina sérica bovina (BSA) como fuente de proteínas a los medios de cultivo embrionario, aunque los resultados obtenidos tanto en producción como en sobrevivencia poscriopreservación tras su inclusión son contradictorios y motivo de numerosos estudios. El suero constituye la fracción líquida resultante del proceso de coagulación sanguínea, tanto in vivo como in vitro, y su calidad, en términos de composición química, depende usualmente del tipo y estado del donante (suero fetal bovino (SFB), suero de



ternero recién nacido, suero de novillo o vaca, suero de vaca en celo (SVC), y de la partida o lote de formulación.

La albúmina es una proteína plasmática de carácter ácido, soluble en agua, con un peso molecular aproximado de 69.000, y constituye uno de los componentes más importantes del suero sanguíneo. Debido a la presencia de grupos reactivos en su molécula, puede unirse a diferentes sustancias (ácidos grasos, hormonas, etc.) y transportarlas en sangre hasta sus órganos blanco. Junto con la inmunoglobulina G, son las proteínas más abundantes del fluido oviductal, y su pureza puede variar entre lotes.

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

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

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



vitro, en función de la cantidad y calidad de los embriones obtenidos.

Se ha observado que la adición de suero a los medios de cultivo tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadios y estimulando el desarrollo de mórulas y blastocistos. Al mismo tiempo, su empleo también se ha visto relacionado con una aceleración del desarrollo embrionario, asociado a un número mayor de células embrionarias y a una mejora en la tasa de producción y eclosión. Sin embargo, otros autores observaron que, tanto la tasa de producción, como el número de células embrionarias no fueron afectados por la presencia o ausencia de suero.” (4)

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

Estudios efectuados sobre embriones producidos in vitro indican que existiría una mayor cantidad de lípidos



así como diferencias en su composición dentro de las gotas citoplasmáticas de los embriones suplementados con suero. Esto podría contribuir a la mayor sensibilidad que estos presentan a la criopreservación, comparados con los obtenidos in vivo o producidos in vitro sin suplementar con suero.

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

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

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



embriones cultivados con suero. Otro compuesto utilizado con el fin de reemplazar la albumina o el suero ha sido el hialuronato el cual ha demostrado resultados alentadores.

De este modo se abre un nuevo camino en el entendimiento de los requerimientos de los embriones en estadios preimplantacionales, en el cual, el uso de medios definidos y libres de macromoléculas de origen biológico altamente variables, tendrá seguramente un rol muy importante.” (12)

2. CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS.

“Constituye una biotécnica que posibilita, mediante la utilización de bajas temperaturas ($-196\text{ }^{\circ}\text{C N}_2$), almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos

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

De las cuales se ha obtenido las siguientes ventajas:

- Independizar en tiempo y espacio la producción de las receptoras.
- Almacenamiento de germoplasma por tiempo indeterminado.
- Comercialización de embriones.
- Aumentar el progreso genético.” (14)



2.1. Congelación.

“La congelación es la técnica de elección para la criopreservación de embriones bovinos producidos in vivo. En este tipo de embriones, la congelación convencional ha permitido obtener resultados ligeramente inferiores a los registrados con embriones en fresco. Al mismo tiempo la introducción del etilenglicol como crioprotector permitió desarrollar la técnica de transferencia directa de embriones congelados-descongelados, posibilitando la aplicación de esta técnica en condiciones de campo, sin necesidad de remover el o los crioprotectores utilizados.

Durante el procedimiento de congelación, las células embrionarias sufren cambios importantes asociados a la formación de hielo intra o extracelular que puedan disminuir la sobrevida poscriopreservación. Para poder minimizar estos problemas se han recurrido al uso de “sustancias crioprotectoras”, así como a tasas de descenso térmico controladas mediante la utilización de máquinas congeladoras programables de alto costo.”(13)

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



También disminuyen el punto de fusión de las soluciones y mantienen el equilibrio intra y extracelular de electrolitos. Otra función es reducir el hielo durante la congelación. También reemplaza las moléculas de agua removidas durante la congelación, inhibe la actividad de muchas enzimas disminuyendo o suprimiendo la actividad de radicales libres responsables de lisis celular antes, durante y después de la congelación y descongelación, y bloquean la toxicidad de otros crioprotectores.” (20)

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

PERMEABLES O INTRACELULARES: De bajo peso molecular.

- Glicerol (G)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- 1-2 propanodiol
- etilenglicol (EG)
- propilenglicol (PG)
- polietilenglicol (PEG)
- etanol
- otros alcoholes

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

IMPERMEABLES O EXTRACELULARES: De alto peso molecular.

- polivinilpirrolidona (PVP)
- glucosa



- fructosa
- ficol
- dextrano sorbitol
- sucrosa
- lactosa
- trealosa
- rafinosa
- otros azucares

Estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las células de los embriones durante el equilibrio.” (1)

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

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



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

Envasado de los embriones.- actualmente el elemento mas utilizado para contener los embriones, tanto para la Criopreservación como para su transporte y/o transferencia a una hembra receptora, lo constituye la pajuela de plástico de 0,25ml de capacidad. Existen diversos modos de cargar las pajuelas, pero en la mayoría, el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de 0,5 a 2 centímetros de solución de congelación separado de las otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones con sacarosa como en el método One-Step separados por burbujas de aire. En general, las pajuelas una vez cargadas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico (Grafico 5).

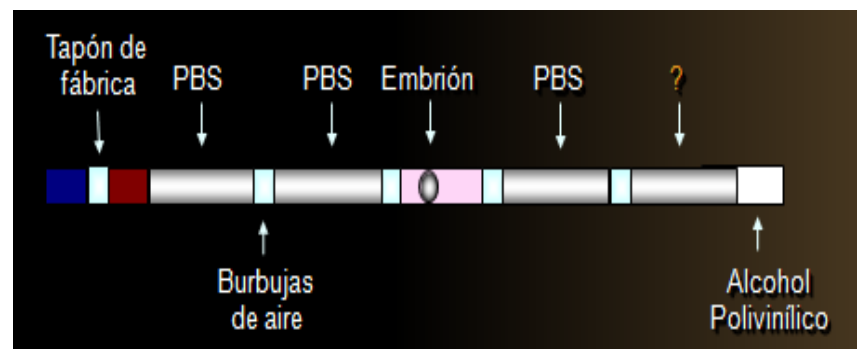


Grafico 5. Envaso de los embriones para congelación.
(Fuente. Mucci. N.)



Enfriamiento inicial.- se efectúa mediante la introducción de los embriones envasados en la criocámara de una maquina congeladora programable. Así, la muestra se enfría desde la temperatura de equilibrio hasta alrededor de -7°C .

Introducción de la cristalización o “seeding”.- esto se efectúa luego de 5-7 minutos de introducidas las pajuelas en la criocámara, tocando el extremo de las pajuelas con un elemento metálico enfriado en N_2 líquido. Con este procedimiento se evita un sobreenfriamiento excesivo de la solución y por lo tanto, se reduce el cambio de temperatura producido por la liberación de calor latente de cambio de estado.

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

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

Almacenamiento de N_2 líquido.- se efectúa en contenedores (termos) de N_2 líquido a -196°C .” (a30)



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

Extracción de los crioprotectores.- luego de la congelación-descongelación la mayoría de los agentes crioprotectores deben ser extraídos de los embriones antes de ser transferidos a hembras receptoras o colocados en cultivo. Esto debe efectuarse porque si al momento de la descongelación las células cargadas de crioprotectores son expuestas por ejemplo a una solución PBS isosmolar respecto de las células en condiciones normales o al tracto reproductor femenino, debido a que el agua difunde mas rápido que estos compuestos a través de la membrana plasmática, las células se desintegran por el shock osmótico. Por este motivo se recurre a la rehidratación del embrión mediante pasajes a través de concentraciones y osmolaridades decrecientes del crioprotector utilizado. Otra alternativa es emplear sustancias no penetrantes como la sacarosa (buffer osmótico) cuya osmolaridad sea igual o ligeramente inferior a la alcanzada con el crioprotector penetrante utilizado, lo cual disminuye la entrada de agua mientras se produce la salida del crioprotector penetrante.” (12)

• CONGELACION ESTANDAR CON ETILENGLICOL.

1. “Preparar la solución de criopreservación (1,5 o 1,78 M de EG con el agregado o no de 0,1 M de sacarosa, en PBS (solución Stock) (cuadro 1-2) mas el agregado de suero en una proporción final



del 20%. Esta solución se colocara en una placa petri de 35 mm a temperatura ambiente.

REACTIVOS	UNIDADES
EG	1,68 ml
Sacarosa	0,684 g
BSA	80 mg
PBS	14,32 ml

Cuadro 1. Composición del medio de congelación (1).
EG 1,5 Molar + 0,1 Molar de sacarosa.
(Fuente. Mucci. N.)

REACTIVO	UNIDADES
EG	2ml
Sacarosa	0,684g
BSA	80mg
PBS	14,32ml

Cuadro 2. Composición del medio de congelación (2).
Eg 1,78 Molar + 0,1 Molar de sacarosa.
(Fuente Mucci. N.)

2. Identificar la pajuela según normas IETS (grafico 6).

DT 2	515	HO	1254896	Matador	HO	6521487
		05No09		1EMB		

Grafico 6. DT: indica que los embriones son congelados para transferencia directa, debiendo ser además, las pajuelas de color amarillo. 515: nombre o número de la donante. HO: raza de la donante. 1254896: número de registro de la donante. Matador: número o nombre del macho. HO: raza del macho. 6521487: número de registro del macho. 05No09: día,



mes y año del procedimiento. 1EMB: número de embriones en la pajuela.

(Fuente. Mucci. N.)

3. Colocar los embriones en la solución de criopreservación. El tiempo total de los embriones al crioprotector deberá ser de alrededor de 10 minutos.
4. Cargar los embriones en las correspondientes pajuelas y cerrarlas con alcohol polivinílico.
5. Comenzar con el enfriamiento inicial colocando las pajuelas directamente a -7°C en la cámara de enfriamiento de una máquina congeladora programable durante 5 minutos.
6. Efectuar la inducción de la cristalización de manera manual, tocando las pajuelas en uno de sus extremos con un dispositivo metálico enfriado en N_2 líquido.
7. Luego de 5 minutos de inducida la cristalización comenzar el descenso térmico controlado desde -7°C hasta -35°C a razón de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.
8. Una vez alcanzada la temperatura de -35°C , retirar las pajuelas de la cámara de enfriamiento y efectuar el enfriamiento rápido colocando las pajuelas directamente en N_2 líquido (grafico 7).”
(12)



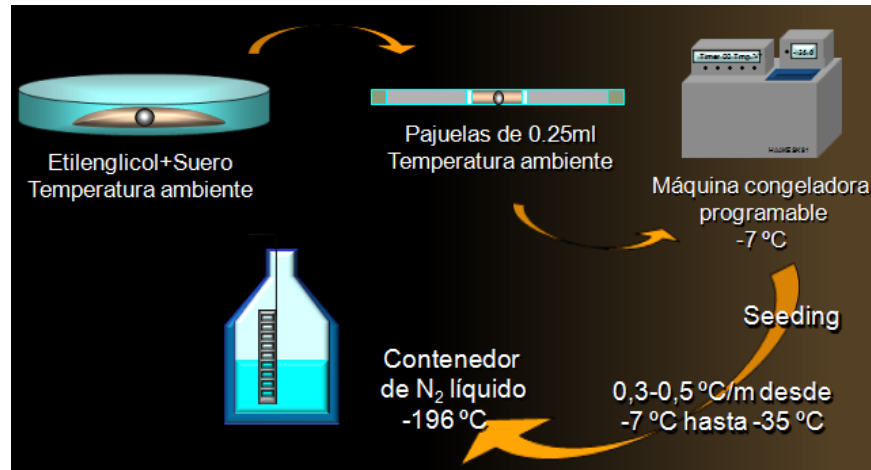


Grafico 7. Protocolo general de congelación de embriones.

(Fuente. Mucci. N.)

2.2. Vitrificación

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

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

Las características generales de la vitrificación son las siguientes:

- Descenso ultrarrápido de la temperatura.



- Utilización de crioprotectores en altas concentraciones.
- Muestra vehiculizada en un pequeño volumen de solución, lo cual posibilita aumentar la tasa de descenso térmico y/o disminuir la concentración de crioprotectores.” (14)

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

Envasado de los embriones en recipientes apropiados y en pequeños volúmenes.- se ha utilizado con éxito las pajuelas de 0,25 ml de capacidad. Sin embargo en búsqueda de la conservación de ovocitos y embriones en pequeños volúmenes, se ha utilizado exitosamente grillas de microscopía electrónica, pajuelas de 0,25 ml abiertas y estiradas (Open Pulled Straw (OPS)) (grafico 8).

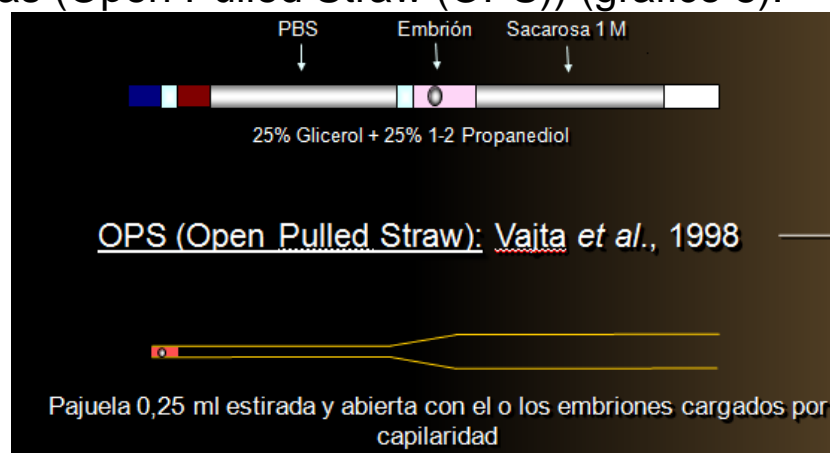


Grafico 8. Envasado de los embriones para vitrificación.

(Fuente. Mucci. N.)

Descenso ultrarápido de la temperatura (vitrificación).- se lleva a cabo en un solo paso introduciendo el soporte del embrión directamente en N₂ líquido, o en dos pasos, enfriándolo previamente durante un corto tiempo en los vapores del mismo. La introducción de las pajuelas de 0,25ml conteniendo soluciones de vitrificación en N₂ líquido permite alcanzar tasas de descenso térmico del orden de los 2.500°C/minuto, mientras que con OPS determinaron tasas de 22.500°C/minuto entre -25 y -175°C.

Calentamiento rápido de los embriones hasta temperaturas fisiológicas.- se introduce la pajuela en un baño María a 20 °C o a temperaturas comprendidas entre los 30 y 39 °C durante pocos segundos.

Extracción de los crioprotectores.- una vez calentadas las pajuelas los crioprotectores penetrantes deben ser retirados de los embriones e inmediatamente deben ser rehidratados. Por ello se utiliza un buffer osmótico en una concentración suficiente para alcanzar una osmolaridad ligeramente inferior a la de la solución de vitrificación, este buffer (sacarosa) puede o no estar en la misma pajuela.” (13)

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

1. “Las pajuelas de 0,25ml de capacidad serán calentadas sobre una platina térmica y estiradas manualmente hasta que su diámetro y pared



disminuyan aproximadamente a la mitad. Posteriormente se procederá al corte de las mismas en su punto más delgado y a su identificación.

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

REACTIVOS	UNIDADES
EG	1ml
DMSO	1ml
TCM-199	6ml

Cuadro 3. Solución 1 para vitrificación de embriones mediante protocolo OPS.

(Fuente. Mucci. N.)

3. Tomar una gota de 40 μ l de solución 2 de vitrificación (cuadro 4), luego con micropipeta tomar el embrión en un volumen de no más de 2 μ l y descargarlo sobre la misma placa. Este proceso debe efectuarse en un total de 30 segundos.

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

Cuadro4. Solución 2 para vitrificación protocolo OPS.
(Fuente. Mucci. N.)



4. Las pajuelas serán cargadas aprovechando el efecto de capilaridad tocando con su extremo más delgado la última microgota donde se descargaron los embriones. Cumplidos los 30 segundos las pajuelas serán sumergidas en N_2 líquido (grafico 9).
5. Todas las maniobras deben ser efectuadas en platina térmica a $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.” (12)

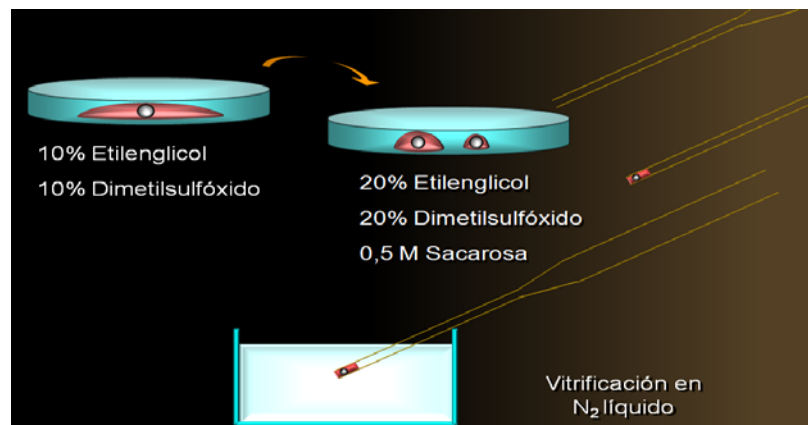


Grafico 9. Técnica O.P.S
(Fuente. Mucci. N.)

3. EVALUACION DE EMBRIONES BOVINOS.

3.1. Clasificación embrionaria.

3.1.1. Estadio de desarrollo embrionario.

“De acuerdo a las normas de la International Embryo Transfer Society (IETS), la clasificación de los embriones en función de su estadio de desarrollo se efectúa de manera numérica de la siguiente manera (grafico 10):



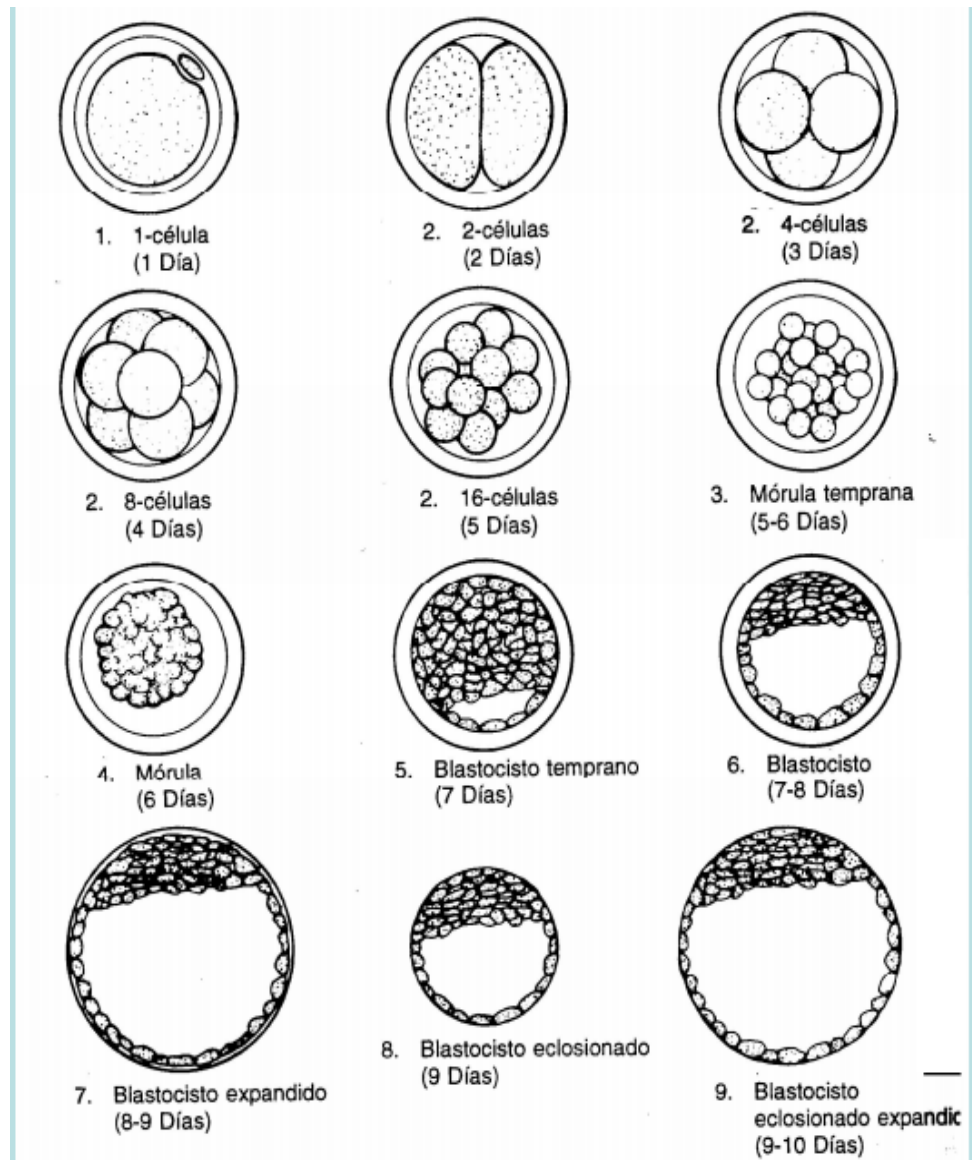


Grafico 10. Clasificación de los embriones según normas IETS.

(Fuente. De la Fuente J.)

El código para el grado de desarrollo es numérico. El número 1 significa un ovocito sin fecundar o un embrión de una célula. El número 2 identifica embriones con 2 a 16 células. El número 3 identifica una mórula temprana, y los números 4 a 9 identifican a los embriones en estadios posteriores a la compactación (cuadro 5).” (12)



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

Cuadro 5. valoración morfológica según IETS.
(Fuente. De la Fuente J.)

3.1.2. Calidad embrionaria.

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

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



- 2. Bueno.-** irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
- 3. Regular.-** irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
- 4. Malo (muerto o degenerado).-** embrión, ovocito e embriones de 1 célula degenerados, no viables.”
(12)

4. PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.

Siempre se deben manejar los embriones usando materiales, medios y útiles estériles. Posteriormente todas las manipulaciones deben seguir los protocolos descritos con total exactitud. Se requiere un cuidado especial para lavar los ovocitos y embriones. Generalmente se usan tres o más lavados entre cada paso de producción de embriones FIV. Se deben usar placas Petri o placas multipocillos estériles conteniendo el medio apropiado. Se recomienda una agitación suave durante cada lavado, solo deben lavarse juntos óvulos y embriones del mismo lote (ovarios de matadero) o recuperados de la misma donante (aspiración de óvulos).(18)



4.1. Metodología para la obtención y maduración de ovocitos.

Día 1.

- **Acondicionamiento del material y aspiración de los ovocitos.**

1. “Los ovocitos obtenidos a partir de ovarios de matadero o de vacas castradas, son transportados al laboratorio en un termo (fotografía 11) con solución fisiológica estéril más el agregado de agentes antimicrobianos (cuadro 6) a una temperatura de 20-25 °C. A esta temperatura los ovarios podrían permanecer en el termo hasta aproximadamente 6-7 horas sin afectar los resultados posteriores. Cuando el transporte deba efectuarse durante un periodo mas prolongado es conveniente disminuir la temperatura hasta unos 15-16 °C.

COMPONENTES	UNIDADES
TL- sperm stock	10ml
BSA	60mg
Piruvato	1,1mg
Gentamicina stock	10µl

Cuadro 6. Formulación final del medio de capacitación.
(Fuente. Mucci. N)



Fotografía 11. Termo de transporte de ovarios.
(Fuente. Mucci.N)



2. Una vez en el laboratorio, los ovarios serán acondicionados, eliminándose los restos de cuerno uterino, oviducto y/o ligamentos (fotografía 12).



Fotografía 12. Acondicionamiento de los ovarios.
(Fuente. Mucci.N)

3. Lavar los ovarios tres veces en solución fisiológica estéril (fotografía 13).



Fotografía 13. Ovarios luego de lavado.
(Fuente. Mucci.N)

4. Posteriormente se procederá a la punción de los folículos de 2-10 mm de diámetro, utilizando agujas de 21g para aspirar su contenido, a 50 mmhg de presión negativa (fotografía 14).





Fotografía 14. bomba de vacío para la aspiración de ovocitos.
(Fuente. Mucci. N)

La importancia de los elementos de punción y aspiración (diámetro de la aguja, largo de la tubuladura, presión de aspiración, entre otros) determinan una buena medida de calidad de los ovocitos recolectados y la eficiencia del sistema de aspiración. Una tasa de recuperación normal se encuentra en alrededor de 50-60% de ovocitos recuperados por folículo punzado (fotografía 15).



Fotografía 15. aspiración de ovocitos.
(Fuente. Mucci.N)

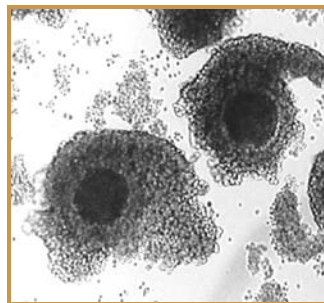
Puede decirse que a medida que aumentamos la presión de aspiración, será posible aumentar la tasa de recuperación, pero al mismo tiempo obtendremos una mayor cantidad de ovocitos desnudos.



5. Los ovocitos obtenidos serán posteriormente seleccionados bajo lupa estereoscópica (x30) (fotografía 16), conservando aquellos que presenten varias capas compactas de células del cumulus y citoplasma homogéneo o con pequeñas granulaciones (grado 1-2) (fotografía 17).” (12)



Fotografía 16. Placa de búsqueda bajo lupa estereoscópica.
(Fuente. Mucci.N)



Fotografía 17. Ovocitos de excelente calidad.
(Fuente. N.Mucci.)

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

1. “Luego del llenado de cada tubo conteniendo fluido folicular, estos deberán permanecer en reposo durante 10-15 minutos con el propósito de



que los complejos cumulus-ovocito decanten y formen un pellet en el fondo del tubo.

2. El pellet será recolectado con pipeta Pasteur
3. colocarlo sobre una placa de búsqueda.

Una alternativa a este ultimo procedimiento seria eliminar el sobrenadante con jeringa o micropipeta hasta dejar un volumen de 2-3mL en el fondo del tubo, el cual se homogenizara y se colocara sobre la placa de búsqueda.

4. Se selecciona los ovocitos y se los lava al menos tres veces mediante el pasaje a través de gotas de medio de maduración sobre placas de Petri (fotografía 18).



Fotografía 18. Lavado de ovocitos. Se realiza a través del pasaje por gotas de medio de maduración.
(Fuente. Mucci.N)

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

5. Una vez lavados y seleccionados, serán posteriormente colocados en grupos de hasta 50



ovocitos por cada celda (fotografía 19), en placas de cultivo, conteniendo medio de maduración.



Fotografía 19. Placas de cultivo. Compuestas de 5 pocillos cargadas con medio de maduración.
(Fuente. Mucci.N)

6. Se pone a cultivar en estufa a 38,5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación durante 20-24 hs (fotografía 20) (grafico 11).” (12)



Fotografía 20. Estufa de cultivo. Control de temperatura y CO₂ utilizada para maduración y fecundación de ovocitos.
(Fuente. Mucci.N)



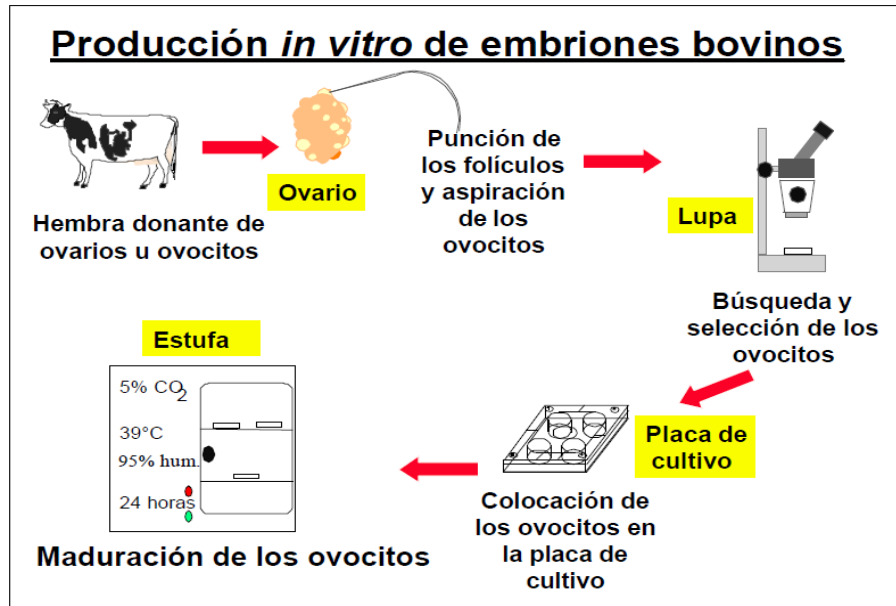


Grafico 11. Esquema PIV desde la obtención de ovocitos hasta la maduración.
(Fuente. INTA.)

4.2. Metodología de la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos. Día 2.

“Entre las 20-24 hs de comenzada la maduración se procede a la fecundación de los ovocitos, utilizándose para este procedimiento semen congelado-descongelado.

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

• Procedimiento:

1. Cargar nuevas placas de cultivo con medio de fecundación. De acuerdo a este protocolo por cada celda se colocara 400µl de medio de fecundación (soluciones salinas: tiroides lactato



modificado (TALP), IVF-SOF; cuadros 7-8-9) + 20 μ l de una solución de heparina diluida en medio de fecundación (cuadro 10) como inductor de la capacitación espermática. Posteriormente colocar en estas placas los ovocitos que fueron puestos a madurar el día anterior.

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de sodio	315mg
Cloruro de K	26,8mg
KH₂PO₄	2mg
Bicarbonato de sodio	105mg
Penicilina	3,25mg
Piruvato de sodio	2,75mg
BSA FAF	400mg
Fructosa	4,5mg
Cloruro de calcio	12,6mg
Aminoácidos	500 μ l
Lactato de sodio	23,5 μ l
Agua ultrapura csp	50ml

Cuadro 7. Medio de IVF-SOF (50ml).
(Fuente. Mucci. N.)

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de sodio	666ml
Bicarbonato de sodio	210mg
Cloruro de	23,5mg



potasio	
KH₂PO₄	4,7mg
Rojo fenol	1mg
Penicilina	6,5mg
Lactato de sodio	186μl
Cloruro de magnesio	10mg
Cloruro de calcio	39,7mg
Agua ultrapura	100ml

Cuadro 8. Medio de fecundación (FIV)
(Fuente. Mucci. N.)

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

Cuadro 9. Formulación final del medio de fecundación.
(Fuente. Mucci. N.)

COMPONENTES	UNIDADES
Heparina	1mg
Medio de fecundación	1ml

Cuadro 10. Dilución de heparina para la fecundación.
(Fuente. Mucci. N.)

- Si el semen esta congelado en pajuelas en N₂ liquido (fotografía 21), la misma deberá descongelarse en un baño Maria a 30°C, durante 30 segundos (fotografía 22). Posteriormente y una vez secada la pajuela se efectuara el corte de uno de sus extremos y se lo introducirá en un tubo de



5ml estéril. Luego se efectuara el corte del otro extremo y se descargará de este modo la columna de semen dentro del recipiente estéril.



Fotografía 21. Termo conteniendo semen en N2 líquido.

(Fuente. Mucci. N.)



Fotografía 22. Baño María utilizado para la descongelación de semen.

(Fuente. Mucci. N.)

3. Independientemente de la forma de la presentación del semen este deberá ser acondicionado con el propósito de eliminar diluyentes, células muertas, etc., mediante al menos una de dos metodologías.
4. Una vez obtenida la suspensión de espermatozoides libre de diluyentes y células muertas, se procede a la determinación de la concentración espermática para efectuar la fecundación con la dosis requerida.



5. Preparar la cámara (neubauer) para conteo de espermatozoides (colocar un cubre objetos (fotografía 23).



Fotografía 23. Cámara de Neubauer.
(Fuente. Mucci. N.)

6. Diluir la suspensión de espermatozoides al 5% en agua. Tomar 95 μl de agua y agregarle 5 μl de la suspensión de semen obtenida luego de la última centrifugación. Homogenizar y cargar la cámara para efectuar el conteo.
7. Llevar al microscopio y contar 5 cuadrados de doble borde (x400)
8. Cálculo para la fecundación: cálculo que contempla la dilución efectuada sobre la muestra espermática dividido por el número de espermatozoides que se contaron. El resultado corresponde al volumen en μl que se debe tomar del tubo que contiene los espermatozoides para fertilizar con un millón de espermatozoides por ml de FIV.
9. Colocar en cada celda de la placa de cultivo la cantidad de semen correspondiente y llevarlas a estufa durante 24hs (grafico 12). La dosis



espermática es generalmente de 1-2 millones de espermatozoides por ml de medio.” (12)

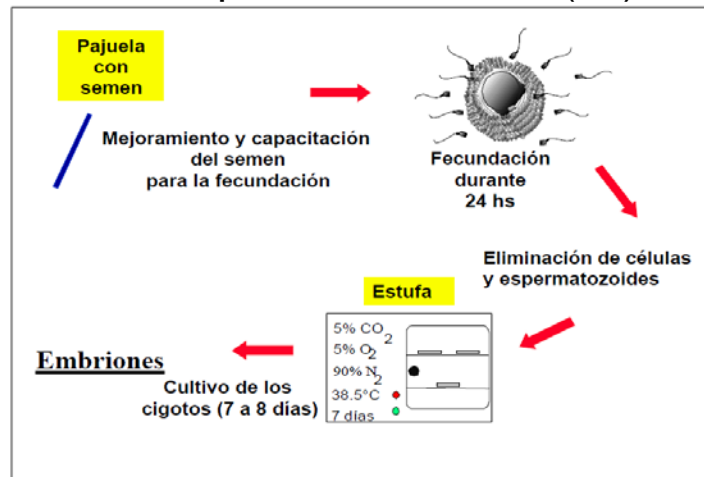


Grafico 12. Esquema PIV para la fecundación.
(Fuente. INTA.)

- **Acondicionamiento del semen por centrifugación gradientes de Percoll.**
1. “Preparar columna de percoll en tubo de centrífuga (14 ml) con 400µl de cada una de las soluciones 30, 60 y 90 % de percoll en este orden por sotoposición (en el fondo del tubo la fracción de 30%, por debajo de esta la fracción de 60% y por debajo de esta la de 90%, con extrema suavidad para no modificar la columna).
 2. Agregar todo el semen descongelado al tubo que contiene la columna de percoll por la pared y en proximidad de la superficie del mismo, de modo que este quede depositado en la parte superior de la misma (fracción 30%). Tapar el tubo y centrifugar durante 10 minutos a 600g.



3. Transcurridos los 10 minutos, sacar el sobrenadante del tubo (diluyente, células muertas, etc.), tomar el pellet del fondo (alrededor de 100 a 200 μ l), que contiene los espermatozoides vivos, y colocarlo en 3 ml de medio de fecundación contenido en un tubo de centrifuga de 14 ml para su lavado. Este tubo se centrifuga a 200g durante 10 minutos.
4. Luego de esto se elimina el sobrenadante, quedando un pellet de aproximadamente 150 μ l conteniendo la suspensión de espermatozoides con la cual se procederá a la fertilización (grafico 13).

Se puede aprovechar este tiempo de 10 minutos para cambiar los ovocitos de las placas de maduración a las nuevas placas con medio de fecundación.” (10)

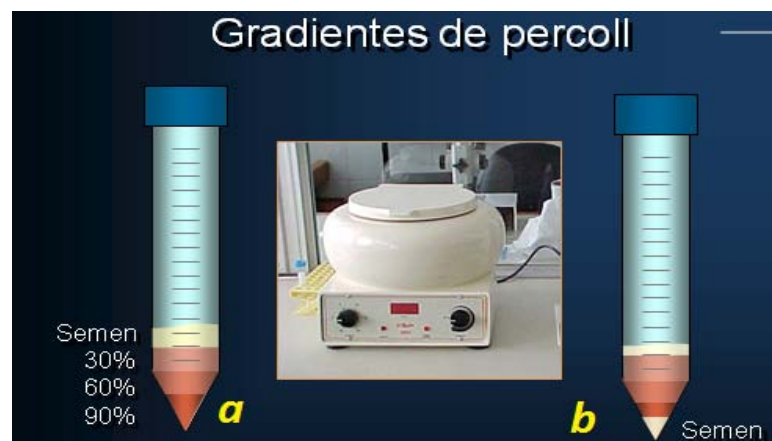


Grafico 13. Técnica de centrifugación en Percoll, (a) semen adicionado sobre la columna de gradientes de percoll en tubos de centrifuga. (b) posición de los espermatozoides motiles luego de la centrifugación a 600g durante 10 minutos.
(Fuente. Mucci. N.)



- **Acondicionamiento del semen utilizando la técnica de swim up.**

1. “Colocar 1ml de medio de fecundación en un tubo de centrifuga y dentro de este el total de la pajueta de semen. Este tubo será centrifugado durante 10 minutos con el propósito de efectuar un lavado de la muestra.
2. Colocar 1ml de medio de capacitación en un tubo de centrifuga y descargar por sotoposición el pellet obtenido luego de la centrifugación. Este tubo se colocara en baño Maria o en estufa durante 1 hora a 38,5 °C. durante este tiempo los espermatozoides con motilidad rectilínea progresiva ascenderán en el medio.
3. Transcurrido este tiempo se extraerá el sobrenadante y se lo descargara en un tubo de centrifuga conteniendo 3,5ml de medio de capacitación durante 10 minutos a 200g.
4. Luego de esto se eliminara el sobrenadante quedando en el pellet la suspensión de espermatozoides con la cual se procederá a la fecundación (grafico 14).” (12)

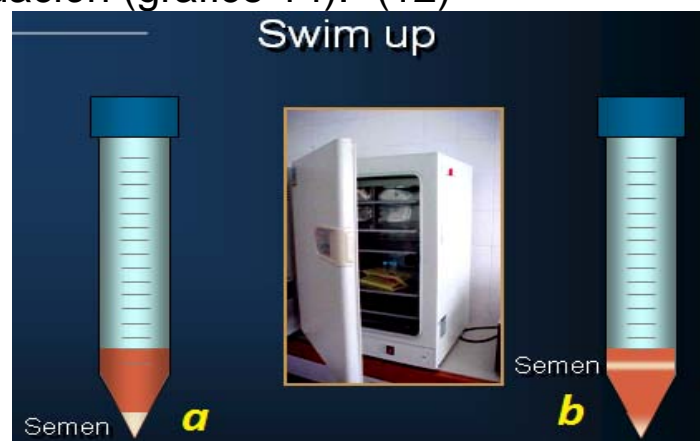


Grafico 14. Técnica de Swim up. (a) semen adicionado por sotoposición a 1ml de medio de capacitación en tubos de centrifuga, (b) posición de los espermatozoides motiles luego de la incubación del tubo durante 1 hora en estufa.
(Fuente. Mucci. N.)

4.3. Metodología para el cultivo in vitro de embriones bovinos.

Día 3.

- **Eliminación del exceso de células del cumulus (desempaquete)**

"Luego de 24hs de la fecundación los presuntos cigotos deben ser desnudados (eliminación del cumulus), lavados en medio de cultivo y colocado en este último en placas donde se efectuó la maduración de los ovocitos (co-cultivo con células de la granulosa) o en nuevas placas (sin co-cultivo) y colocarlos en estufa a 38.5 °C en una atmosfera de 5% de O₂, 90% de N₂ y humedad a saturación hasta 48-72hs, momento en el que se procede al conteo de los ovocitos divididos (porcentaje de división a 48-72hs).

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

- **Procedimiento detallado.**

1. Chequear la placa de maduración por posible presencia de contaminación. Se aspira el contenido y se reemplaza por 400 µl de medio de cultivo (cuadro 11-12). En caso de no efectuar co-



cultivo con células de la granulosa se procederá al llenado de nuevas placas.

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de sodio	670,32mg
Bicarbonato de sodio	220,11mg
Cloruro de potasio	23,11mg
Rojo fenol	1mg
Lactato de calcio	63,55mg
Piruvato de sodio	4mg
Agua ultrapura	100ml

Cuadro11. Medio de cultivo CR1 Stock para cultivo de embriones.

(Fuente. N.Mucci)

COMPONENTES	UNIDADES
CR1 stock	9,7ml
BSA	30mg
BME (aa. No esenciales)	200 μ l
MEM (aa. Esenciales)	100 μ l
Glutamina	1,5mg

Cuadro 12. Formulación final del medio de cultivo CR1 suplementado con 3mg/ml de BSA y aminoácidos (aa).

(Fuente. N.Mucci)

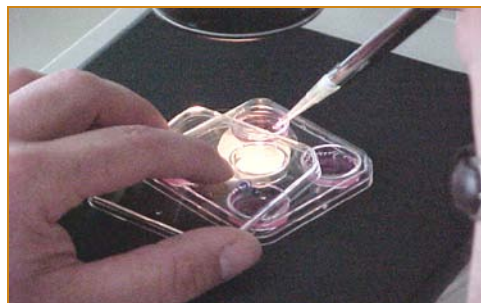
2. Preparar la pipeta con capilar de vidrio necesaria para el manejo de los embriones.



3. Colocar 400 μ l de medio de cultivo en un tubo de centrifuga y pasar los presuntos cigotos a este, para efectuar el desempaque mediante agitación mecánica utilizando un vortex durante 2 minutos (fotografía 24) o mediante la utilización de micropipetas (fotografía 25).



Fotografía 24. Agitación en vortex. Útil para la eliminación de las células de la granulosa.
(Fuente. Mucci. N.)

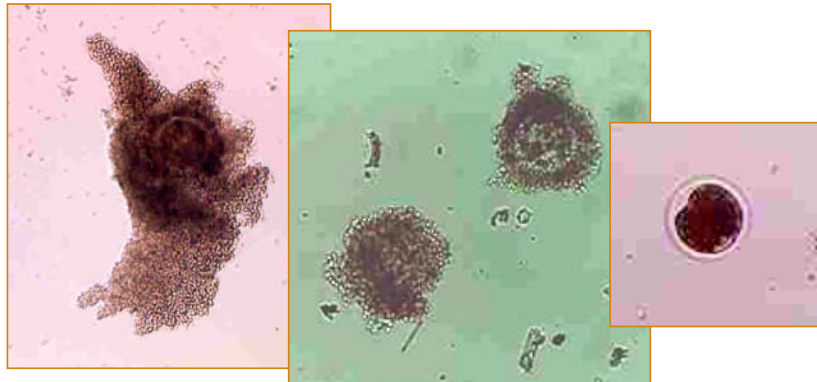


Fotografía 25. micropipeta.
(Fuente. Mucci. N.)

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



5. Efectuar la búsqueda (fotografía 26) y el lavado de los cigotos mediante el pasaje a través de gotas de medio de cultivo.



Fotografía 26. Cigotos luego del desempaque.
(Fuente. Mucci. N.)

6. Es necesario realizar varios lavados y búsquedas del tubo hasta que no aparezcan mas cigotos (2-3 veces). Posteriormente observar el tubo bajo lupa para detectar la posible presencia de cigotos adheridos a su pared.
7. Una vez lavados y seleccionados, colocar los presuntos cigotos en las placas de cultivo previamente preparadas.
8. Colocar la placa en estufa y cultivar bajo las condiciones descritas, estufa a 38.5 °C en una atmosfera de 5% de O₂, 90% de N₂ y humedad a saturación hasta 48-72hs.
9. Posteriormente se continúa con el cultivo hasta el día 7 donde se evalúa el porcentaje de producción de embriones en sus diferentes estadios (grafico 15) y se procede a su transferencia o criopreservación.” (12)

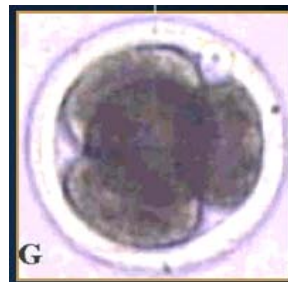




Estadio de dos células.



Estadio de cuatro células.

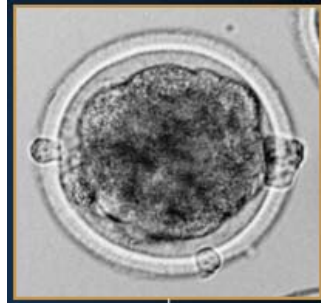


Estadio de 8-16 células.

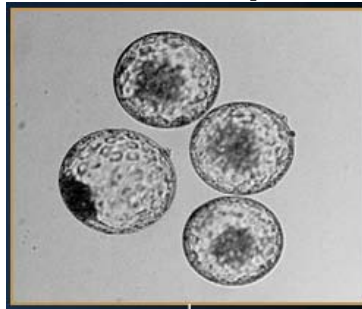


Mórula compacta.





Blastocisto- blastocisto expandido.



Blastocisto protruyendo.



Grafico 15. Estados embrionarios en periodo de cultivo.

(Fuente. Mucci. N.)

4.4. Descongelación.

- **Embriones congelados con etilenglicol.**

1. “Retirar la pajuela del N₂ líquido.
2. Exponer la pajuela al aire durante 5 segundos tomándola desde sus extremos. Con este procedimiento evitamos la ruptura del tapón de fábrica y la entrada de agua dentro de la pajuela durante la descongelación.



3. Introducción de las pajuelas en agua a 35°C durante 30 segundos.
4. Cortar el extremo opuesto al del tapón de fabrica y colocarla con este ultimo hacia atrás en una pistola de transferencia.” (12)

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

1. “Retirar las pajuelas del termo y colocarlas en un recipiente aislante conteniendo N₂ liquido.
2. Introducir el extremo de la pajuela directamente en una placa petri de 35mm cargada con 3ml de la solución 1 de calentamiento (cuadro 9) durante 3 minutos.
3. Posteriormente los embriones serán colocados 1 minuto en gotas de la solución 2 de calentamiento (cuadro 10)
4. Pasado este tiempo los embriones serán lavados en PBS + suero al 20% mediante pasaje por gotas sobre placas petri en donde permanecerán hasta el armado de las pajuelas para la transferencia.
5. Todas las maniobras se efectúan sobre platina térmica a 38,5°C.” (12)



4.5. Transferencia.

Los embriones se transferirán quirúrgicamente realizando una laparotomía en la fosa paralumbar y con una pequeña incisión se depositaba el embrión directamente en el útero, en la actualidad se transfiere por la vía no quirúrgica a través del cuello del útero depositando directamente el embrión en el cuerno ipsolateral donde se encuentra ovulando la receptora. (10)

✓ TÉCNICA DE TRANSFERENCIA NO QUIRURGICA TRANSCERVICAL.

1. “Las vacas receptoras deben ser seleccionadas en el día 7 del ciclo estral (día 0= estro), detectándolo con o sin sincronización.
2. Los embriones se cosechan al día 7-8 después de la fertilización, se los identifica en un microscopio y se transfieren los embriones de calidad excelente y buena.
3. Una vez realizado el examen rectal de la receptora y constatada la presencia de un CL se inyecta una anestesia epidural baja (solución de xilocaína al 2%).
4. La región perineal y vulva se lavan con jabón desinfectante, agua y se secan.
5. El embrión es entonces colocado dentro de una pajuela esterilizada (0.25–0.5 ml) a la que se le ha cortado un extremo (aproximadamente 1,5 cm.), esto se realiza para que no se doble al ser introducida en el cérvix con la consiguiente pérdida del embrión.



6. La colocación del embrión dentro de la pajuela se realiza de tal forma que el medio que posee el embrión queda entre 2 gotas de medio; separadas por aire.
7. Posteriormente la pajuela con el embrión se coloca dentro de la pistola de transferencia y ésta dentro de la pipeta plástica que, previamente ha sido esterilizada.
8. Con la mano izquierda el operador sujeta el cérvix a través de la pared del recto. La pipeta se introduce en el canal cervical y su extremo se ubica, con ayuda de la mano izquierda, en el cuerno ipsilateral al CL.
9. Una vez en la posición deseada (un poco más allá del cuerpo del útero) el embrión es depositado suavemente y la pistola se retira lentamente.
10. Todo este procedimiento debe realizarse lo más rápido y delicadamente posible. El exceso de manipulación producirá daño a la mucosa del útero, que se traducirá en una baja en los resultados.
11. Aparte de la destreza y experiencia que son necesarias, con cualquiera de las técnicas descritas, es necesario que las receptoras sean animales sanos, que sus ciclos reproductivos hayan sido normales y que estén en buen estado de nutrición.
12. En la medida que las receptoras estén en buenas condiciones, tanto sanitarias como nutricionales y reproductivas, y la técnica sea bien realizada, la eficiencia de la transferencia de embriones, traducida en preñeces, será mayor.” (10)



IV. CONCLUSIONES.

1. La producción in vitro de embriones es una biotécnica con alto valor científico para la investigación y producción animal.
2. Herramienta necesaria en programas de transgénesis y clonación.
3. Baja eficiencia y baja sobrevivencia poscriopreservación.
4. Biotécnica complementaria a la producción *in vivo* de embriones
5. El resultado de la criopreservación depende en gran medida de la calidad del embrión obtenido, así como también de su estructura celular.
6. Biotécnica útil para conservar material genético valioso luego de que el animal ha muerto.
7. Una de las grandes limitantes que evita la difusión masiva de esta biotecnología en nuestro medio, es el alto costo de los equipos para implementar un laboratorio.



V. BIBLIOGRAFIA.

1. **CELESTINOS M. GATICA R**, Vitrificación como técnica de criopreservación de embriones bovinos. Arch. Med. Vet, 2002;34(2): pp.157-165.
2. **DE LA FUENTE J**. Producción asistida en el vacuno de leche, obtención y evaluación. [Web en línea]. [2009] [con acceso el 2011 enero 28]. Disponible en URL:http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/picture/x/17_12_54_3_CORDOBA_completo1.pdf
3. **DÍEZ C. MUÑOZ M. CAAMAÑO JN. GÓMEZ E**. Biotecnologías reproductivas: Producción y Criopreservación de embriones in Vitro. Tecnología agroalimentaria. [Web en línea]. [2010] [con acceso el 2011 febrero 4] [41-46pag]. Disponible en URL: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>
4. **FELMER R**, Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch. Med. Vet, 2006;38(2): pp.97-104.
5. **FERNÁNDEZ A. DÍAZ T. MUÑOZ G**, Producción in vitro de embriones bovinos. Rev. Fac. Cs. Vet, 2007;48(1):51-60.
6. **GARDE J. LÓPEZ L. GALLEGO M**. Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. [Web en línea]. [1996] [con acceso el 2011 enero 15]; [83-86pag]. Disponible en: URL:http://books.google.com/books?id=DzRV7xD5_QC&pg=PA84&dq=obtencionde+ovocitos+bovinos&hl=es&ei=zvmMTbu7II GatwfmkGcDQ&sa=X&oi=book result



[&ct=result&resnum=5&ved=0CDwQ6AEwBA#v=onepage&q&f=false](#)

7. **GIANNOTTI A.** Breve historia de la técnica de la fecundación in vitro para su uso en la cría de los animales. [Web en línea]. [con acceso el 2011 enero4]; [1pag]. Disponible en:
URL:http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=24

8. **HERNÁNDEZ HF.** Fecundación in vitro.[Web en línea]. [2005] [con acceso el 2011 febrero 20]; [5pag]. Disponible en:
URL:http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf

9. **HERRADÓN PG. QUINTELA LA. BECERRA JJ. RUIBAL. S. FERNÁNDEZ M.** Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora Genética en Bovinos. [Web en línea]. [2007] [con acceso el 2011 febrero 18]; [8pag] Disponible en:
URL:http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2015%20Supl/p_herradon.pdf

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

11. **INTA,** [Aplicación de la producción in vitro de embriones en producción animal.](#) [Web en línea]. [2004] [con acceso el 2011 enero 24]; [4pag]. Disponible en:
URL:<http://www.inta.gov.ar/expo/intaexpone/intaexpone04/charlas/saubidet/embrio.pdf>



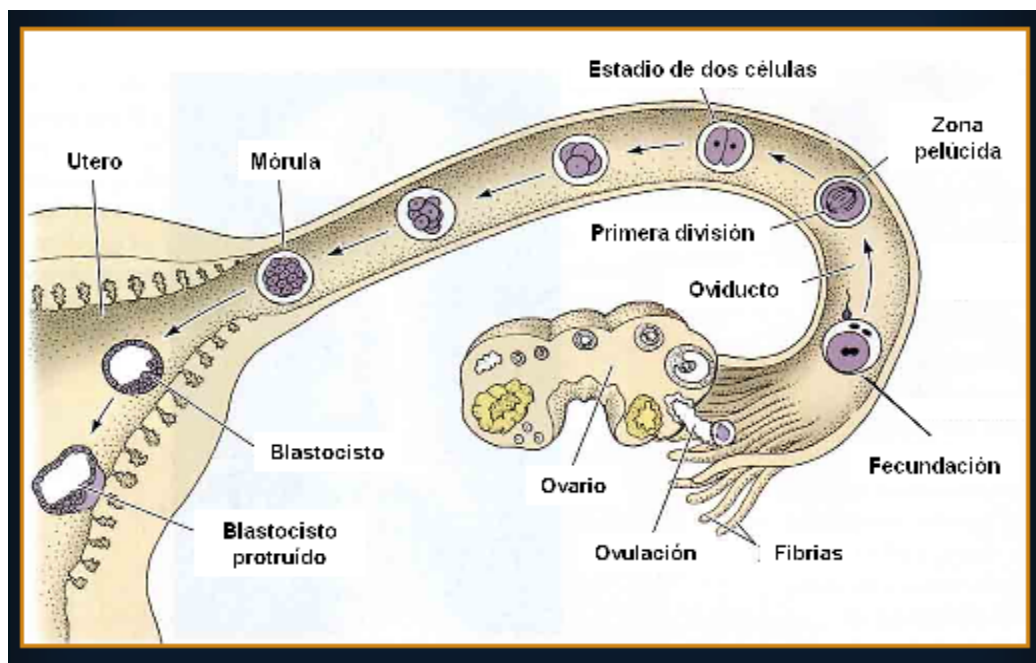
12. **INTA**, Memoria técnica curso de graduación: Producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos. Argentina, Balcarce: 2010 Junio, pp. 1-85.
13. **MUCCI N. ALLER J. CABODEVILA J. KÁISER J. HOZBOR F. ALBERIO R**, Producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos: 2010 p. 1-10. Arch. Med. Vet, 2006;38(2): pp.97-104.
14. **MUCCI N**, Memoria técnica curso de graduación: criopreservación de embriones bovinos, aspectos criobiológicos y técnicos. Balcarce, Buenos Aires: 2010.
15. **MUCCI N**, Memoria técnica curso de graduación: PIV de embriones bovinos aspectos técnicos y biológicos. Balcarce, Buenos Aires: 2010.
16. **RUIZ LS**. Ovum Pick Up en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. [Web en línea]. [2006] [con acceso el 2011 febrero 4]; [6pag]. Disponible en [URL:http://es.scribd.com/doc/32729927/cys-31-58-63-OVUM-PICK-UP-OPU-en-bovinos-Aplicaciones-en-Biotecnologi%CC%81a-de-la-reproduccio%CC%81n](http://es.scribd.com/doc/32729927/cys-31-58-63-OVUM-PICK-UP-OPU-en-bovinos-Aplicaciones-en-Biotecnologi%CC%81a-de-la-reproduccio%CC%81n)
17. **SERIZIER A**. Fecundación in vitro. [Web en línea]. [con acceso el 2011 febrero 13]; [28pag]. Disponible en: [URL:http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf](http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf)
18. **STRINGFELLOW. DA., SIEDEL. SM.**, Manual de la sociedad internacional de transferencia de embriones (I.E.T.S), 3ed, Alabama USA. 2000



19. **FILIPIAK Y. LAROCCA C.** Fertilización in vitro en bovinos, manual teórico práctico. [Web en línea]. [2010] [con acceso el 2011 febrero 2]; [26pag]. Disponible en: [URL:http://es.scribd.com/doc/28374273/Fertilizacion-In-Vitro-en-Bovinos](http://es.scribd.com/doc/28374273/Fertilizacion-In-Vitro-en-Bovinos)

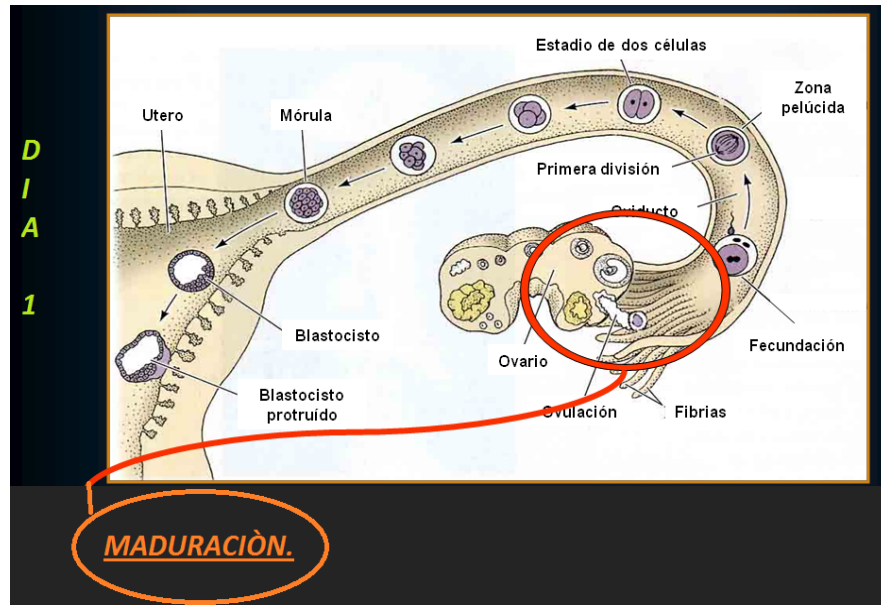
20. **ZARATE OE,** Tesis: comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos; Veracruz: 2006. p.6.

VI. ANEXOS.

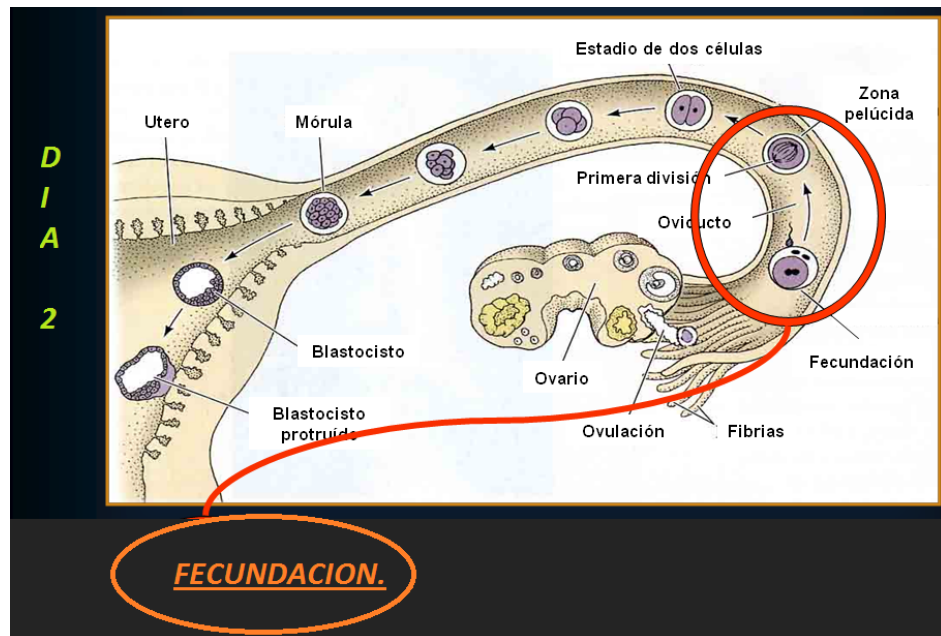


Anexo 1. Localización fisiológica de los embriones en el útero.
(Fuente. N.Mucci.)



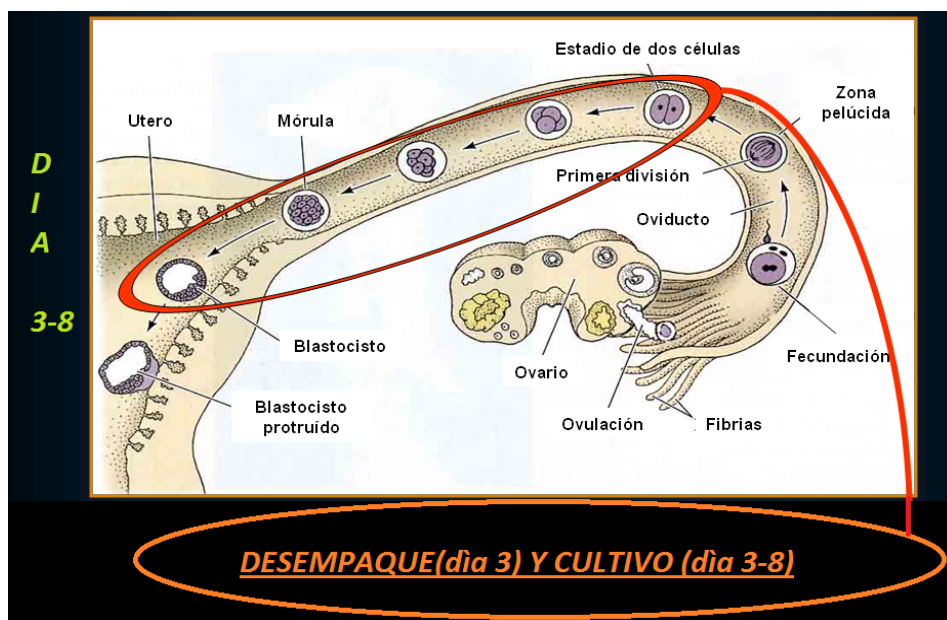


Anexo 2. Sitio donde se produce la obtención de los ovocitos para el día 1.
(Fuente. N.Mucci.)



Anexo 3. Lugar donde en condiciones normales se realizaría la fecundación.
(Fuente. N.Mucci.)





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

Anexo 5. Medios utilizados en la maduración de ovocitos.

REACTIVOS	UNIDADES
TCM 199	10ml
Hepes	140g
Bicarbonato de sodio	300mg
Piruvato de sodio	25mg
Gentamicina stock	110 μ l
Lactato de calcio	60mg
Rojo fenol	1mg
Agua ultrapura	90ml



Cuadro 1. Medio de maduración de ovocitos TCM-199 modificado por Parker stock.

Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES
MPM stock	9ml
Suero de vaca en celo SBC	1ml
hormona folículo estimulante recombinante humana (FSH-rh)	100 μ l
Cisteamina	100 μ M

Cuadro 2. Formulación final del medio TCM-199 modificado por Parker.

Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES
TCM-199	1ml
Carbonato de sodio	22mg
Glutamina	1mg
gentamicina stock	55 μ l
Estradiol	10 μ g
LH	10 μ g
rojo fenol	1mg
FSH-rh	100 μ l
Cisteamina	100 μ M
EGF	100 μ l
Agua ultrapura	9ml

Cuadro 3. Medio de maduración del ovocito B-199 (10ml)

Fuente (Mucci. N.)

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



FSH-rh	75UI
MPM	75ml

Cuadro 4. Formulación de FSH-rh stock.
Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES
Sulfato de gentamicina	50mg
Solución fisiológica estéril	1ml

Cuadro 5. Gentamicina stock.
Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES
Cisteamina	5g
TCM-199 + bicarbonato de sodio	33,33ml

Cuadro 6. Formación de cisteamina stock.
Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES
EGF	0,01mg
SOF	2ml

Cuadro 7. Formulación de Epidermal Growth factor (EGF stock)
Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES
Estradiol	1mg
medio de maduración	1ml

Cuadro 8. Formulación de estradiol stock.
Fuente (Mucci. N.)



Anexo 6. Medios utilizados durante la fecundación de ovocitos.

REACTIVOS	UNIDADES
Cloruro de sodio	580mg
Bicarbonato de sodio	209mg
HEPES	238mg
NaH₂ PO₄	4mg
Rojo fenol	1mg
Lactato de sodio	0,4ml
Cloruro de magnesio	31mg
Cloruro de calcio	38,4mg
agua ultrapura	1ml

Cuadro 1. Cuadro de capacitación stock. (TL-sperm)
Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES
Cloruro de sodio	315mg
Cloruro de K	26,8mg
KH₂ PO₄	2mg
Bicarbonato de sodio	21mg
Penicilina	3,25mg
HEPES acid free	120mg
HEPES sodium salt	130mg
Piruvato de sodio	2,75mg
BSA FAF	150mg
Cloruro de calcio	12,6mg
Lactato de sodio	23,5µl
Agua ultrapura csp	50ml



Cuadro 2. Medio de mesada H-SOF (50ml) para el lavado del semen y embriones.

Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES
Piruvato de sodio	11mg
Solución fisiológica estéril	5ml

Cuadro 3. Formulación de Piruvato stock.

Fuente (Mucci. N.)

REACTIVOS	UNIDADES POR 5L	UNIDADES POR 1L
Cloruro de sodio	42,5g	8,5g
Estreptomicina sulfato	2,5g	0,5g
Penicilina G	500.000 UI; 0,292 g	100.000UI; 0,0584g

Cuadro 4. Formulación de solución fisiológica.

Fuente (Mucci. N.)

