

# UCUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

*Evaluación de diferentes protocolos de maduración y fecundación in vitro de COC'S  
en bovinos*

Trabajo de titulación previo a  
la obtención del título de  
Médico Veterinario  
Zootecnista

Autores:

Luis Manuel Espinoza Siguencia

CI: 0302797329

Correo electrónico: [luismanuelespinozas@hotmail.com](mailto:luismanuelespinozas@hotmail.com)

James Genaro Calle Zárate

CI: 1716089857

Correo electrónico: [genas.calle@outlook.com](mailto:genas.calle@outlook.com)

Director:

Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga

CI: 0102635463

**Cuenca, Ecuador**

20 de septiembre de 2022

## Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo valorar la eficiencia de tres protocolos de maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos, mediante la utilización de dos medios producidos en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (in house 1 y 2), frente a medios comerciales. Se realizaron dos experimentos, el primero determinó la eficiencia de la maduración *in vitro* y el segundo la fertilización *in vitro*. Los tratamientos correspondieron a dos medios elaborados en el laboratorio “in house 1 = T1 e in house 2 = T2” y un medio comercial “BO-IVM™= T3”, que fue utilizado como testigo. Los resultados determinaron la existencia de diferencia estadística en la expansión de células cúmulos ( $p < 0,05$ ) en el grado 2, siendo menores en T1 (23,9%) y T2 (18,4%) en relación al T3 (30,7%), y en el grado 3, T1 (65,9%) y T2 (71,1%) fueron similares, pero T3 presentó un porcentaje menor 59% a los dos tratamientos anteriores ( $p < 0,05$ ). En la evaluación de la progresión de la meiosis, en el estadio vesícula germinal, no se hallaron diferencias significativas en los tratamientos, pero si en Metafase II, T3 (82,60%), T2 (69,80%), este último tiene valores similares con in house 1 (75,60%). Finalmente, en la formación de pronúcleos luego de la fecundación *in vitro*, se evidenció diferencias estadísticas entre T3 (89,5%) y T1 (79,3%); además, entre T1 y T2 (70,9%) se observó diferencia entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, se concluye que el medio de maduración *in vitro* in house 1 elaborado en el laboratorio es eficiente igual que el medio comercial. Sin embargo, el medio T3 permite la obtención de mayor porcentaje de pronúcleos posterior a las 24 horas de FIV.

**Palabras claves:** Maduración *in vitro*. Fertilización *in vitro*. COC´s. Tratamientos

## Abstract

The objective of this research was to evaluate the efficiency of three protocols for *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes, using two media produced in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences (in house 1 and 2), versus commercial media. Two experiments were carried out, the first one determined the efficiency of *in vitro* maturation and the second one the *in vitro* fertilization. The treatments corresponded to two media elaborated in the laboratory "in house 1 = T1 and in house 2 = T2" and a commercial medium "BO-IVMTM= T3", which was used as a control. The results determined the existence of statistical difference in the expansion of cumulus cells ( $p < 0.05$ ) in grade 2, being lower in T1 (23.9%) and T2 (18.4%) in relation to T3 (30.7%), and in grade 3, T1 (65.9%) and T2 (71.1%) their percentages were similar, but T3 presented a lower percentage 59% to the two previous treatments ( $P < 0.05$ ). In the evaluation of meiosis progression, in the germinal vesicle stage, no significant differences were found in the treatments, but in Metaphase II, T3 (82.60%), T2 (69.80%), the latter has similar values with in house 1 (75.60%). Finally, in the formation of pronuclei, after *in vitro* fertilization, statistical differences were evidenced between T3 (89.5%) and T1 (79.3%); moreover, between T1 and T2 (70.9%) difference was observed between the treatments ( $p < 0.05$ ). Therefore, it is concluded that the *in vitro* maturation medium in house 1 elaborated in the laboratory is as efficient as the commercial medium. However, T3 medium allows obtaining a higher percentage of pronuclei after 24 hours of IVF.

**Keywords:** *In vitro* maturation. *In vitro* fertilization. COC's. Treatments

## Índice General

<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Índice General .....</b>	<b>4</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>8</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>9</b>
<b>Índice de Anexos.....</b>	<b>10</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>15</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>16</b>
<b>Abreviaturas y simbología .....</b>	<b>17</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1.1 General .....	21
2.1.2 Específicos.....	21
<b>3 REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
3.1 Producción in vitro de embriones Bovinos .....	22
3.2 Métodos empleados para la recolección de ovocitos.....	22
3.2.1 Recolección y transporte de ovarios desde el matadero.....	22
1.1.1 Aspiración folicular .....	23
1.2 Búsqueda y clasificación de COC's.....	23

1.2.1	Búsqueda .....	23
1.2.2	Clasificación según la calidad de ovocitos .....	23
1.3	Etapas para la PIVE de embriones bovinos.....	24
1.3.1	Maduración de ovocitos.....	24
1.3.2	Fecundación de ovocitos.....	25
1.3.3	Cultivo de embriones.....	25
1.4	Medios utilizados para PIVE.....	26
1.4.1	Medios comerciales.....	26
1.4.1.1	Medio de Maduración BO-HEPES-IVM™ (IVF Bioscience)	26
1.4.1.2	Medio de fertilización BO-IVF™ comercial (IVF Bioscience)	26
1.4.2	Medios de maduración <i>in vitro</i> de fabricación en laboratorio “in house”. Utilización de SFB, HCG y EGF en medios de maduración <i>in vitro</i>	27
1.4.2.1	Suero Fetal Bovino (SFB).....	27
1.4.2.2	Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG) .....	27
1.4.2.3	Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) .....	28
1.5	Pruebas para determinar maduración nuclear .....	28
1.6	Evaluación de fertilidad .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1	Materiales.....	32
4.1.1	Materiales Biológicos.....	32

4.1.2	Materiales Químicos.....	32
4.1.3	Materiales de Laboratorio .....	32
4.2	Métodos .....	33
4.2.1	Área de estudio .....	33
4.2.1.1	Lugar de la investigación .....	33
4.2.2	Preparación de medios.....	34
4.2.2.1	Experimento 1 .....	34
4.2.2.2	Medio de maduración comercial (BO-IVM™=T3) .....	35
4.2.3	Experimento 2 .....	35
4.2.4	Medio de fecundación comercial (IVF-Bioscience=T3) .....	38
4.2.5	Preparación del medio de montaje .....	39
4.3	Diseño Experimental .....	39
4.3.1	Experimento 1 .....	39
4.3.2	Experimento 2 .....	40
4.4	Metodología para la Investigación experimental.....	40
4.4.1.1	Recolección de ovarios.....	40
4.4.1.2	Recuperación y clasificación de COC's .....	41
4.4.1.3	Clasificación de los COC's .....	41
4.4.1.4	Maduración in vitro (MIV).....	42
4.4.1.5	Valoración de la expansión de las células del cúmulus... ..	42
4.4.1.6	Evaluación de la progresión de la meiosis luego de la maduración in vitro .....	42
4.4.1.7	Fecundación in vitro (FIV).....	43

4.4.1.8	Determinación del porcentaje de fecundación in vitro .....	44
4.5	Análisis estadístico .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
5.1	Valoración general de la expansión de células cúmulus, progresión de meiosis y pronúcleos .....	45
5.2	Resultados de la maduración <i>in vitro</i> analizada por tratamientos	46
5.3	Evaluación de la progresión de la meiosis en los tratamientos .	48
5.4	Evaluación de la formación de pronúcleos en los tratamientos post-FIV.....	50
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>63</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Medio de maduración “in house 1=T1” .....	34
<b>Tabla 2:</b> Medio de maduración “in house 2=T2” .....	35
<b>Tabla 3:</b> Medio de fecundación “in house 1=T1” .....	36
<b>Tabla 4:</b> Suplemento 1 para 4ml .....	36
<b>Tabla 5:</b> Medio de fecundación “in house 2=T2” .....	37
<b>Tabla 6:</b> Suplemento 2 para 4 ml .....	37
<b>Tabla 7:</b> Sperm Talp 5 ml .....	38
<b>Tabla 8:</b> Medio de lavado de ovocitos .....	38
<b>Tabla 9:</b> Reactivos para tinción de ADN.....	39



## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis, parroquia Victoria del Portete.....	33
<b>Figura 2:</b> Porcentaje de expansión de las células del cúmulus de los COC's (Panel 1), ovocitos que llegaron a metafase II (Panel 2) y ovocitos que presentaron pronúcleos (Panel 3). Considerando el total de ovocitos valorados sin considerar tratamientos. ....	45
<b>Figura 3:</b> Porcentaje de expansión de las células del cúmulus de los COC's luego de 24 horas de maduración in vitro en los tratamientos evaluados. ns=No hay diferencia entre tratamientos. *= diferencia estadística entre tratamientos. Prueba de Chi cuadrado 5%. ....	47
<b>Figura 4:</b> Porcentaje de COC's que llegaron a la metafase II (MII) en los tratamientos evaluados. ns=No hay diferencia entre tratamientos. *= diferencia estadística entre tratamientos. Prueba de Chi cuadrado al 5%. ....	48
<b>Figura 5:</b> Porcentaje de ovocitos que llegaron a formar pronúcleos en los tratamientos evaluados. *= diferencia estadística entre tratamientos. Prueba de Chi cuadrado al 5%. ....	50

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1:</b> Objetivo 1 “Evaluación de la expansión de las células de cúmulus”.. .....	63
<b>Anexo 2:</b> <i>Objetivo 2 “Evaluación de la maduración nuclear posterior a la MIV”</i> .....	67
<b>Anexo 3:</b> <i>Objetivo 3 “Evaluación de la progresión de la meiosis posterior a la FIV”</i> .....	69

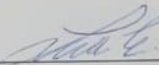
**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el  
Repositorio Institucional**

---

Luis Manuel Espinoza Siguenca en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación Evaluación de diferentes protocolos de maduración y fecundación *in vitro* de COC'S en bovinos, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de septiembre del 2022



---

Luis Manuel Espinoza Siguenca

C.I. 0302797329

**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional**

---

James Genaro Calle Zárate en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación Evaluación de diferentes protocolos de maduración y fecundación *in vitro* de COC'S en bovinos, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 20 de septiembre del 2022



---

James Genaro Calle Zárate

C.I: 1716089857

### Cláusula de Propiedad Intelectual

Luis Manuel Espinoza Sigüencia, autor del trabajo de titulación EVALUACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE MADURACIÓN Y FECUNDACIÓN *IN VITRO* DE COC'S EN BOVINOS certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 20 de septiembre del 2022



---

Luis Manuel Espinoza Sigüencia

C.I: 0302797329

### Cláusula de Propiedad Intelectual

James Genaro Calle Zárate, autor del trabajo de titulación EVALUACIÓN DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE MADURACIÓN Y FECUNDACIÓN *IN VITRO* DE COC'S EN BOVINOS certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 20 de septiembre del 2022



---

James Genaro Calle Zárate

C.I: 1716089857

## Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a Dios por bendecirme y guiarme por el camino del bien durante toda mi carrera universitaria.

De manera muy especial quiero dar gracias a mis queridos padres Manuel y Sandra por la paciencia, confianza y cariño recibido, gracias por ser el pilar fundamental en mi vida y por ser los promotores principales de mis sueños, sin su ayuda no habría alcanzado mi objetivo.

Gracias a mis hermanos Geovanna y Luis Robertho por brindarme siempre su entusiasmo, alegría y compañía.

Gracias a mis abuelitos, tíos y novia quienes me apoyaron y fueron parte de mi camino.

Quiero también agradecer al doctor Luis Ayala por haberme dejado ser parte de su equipo de trabajo y por apoyarnos en todo nuestro proyecto.

Gracias al doctor Xavier Samaniego por brindarnos sus conocimientos y ayuda.

Luis Espinoza

Agradezco tener la oportunidad de poder servir a la sociedad de una mejor manera y aportar con lo que sea posible para tener un mundo mejor.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo y la resiliencia, no estaría donde estoy sin su inagotable esperanza y cariño. Su presencia me ha motivado a buscar este logro.

A nuestro tutor de tesis, Dr Luis Ayala que ha demostrado ser un excelente maestro, tutor y amigo brindando toda la atención y responsabilidad necesarias para un correcto desarrollo de nuestras actividades.

A todos los docentes y compañeros que estuvieron presentes en nuestro proceso de elaboración de tesis.

Genaro Calle

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis con todo mi corazón y cariño a mis padres Manuel y Sandra por siempre estar a mi lado apoyándome en cada uno de mis pasos e inculcarme buenos valores en todo momento, por su amor incondicional, motivación y esfuerzo constante que permitieron que logre culminar mi carrera profesional.

Luis Espinoza

Este trabajo está dedicado a mis padres, quienes han sido mi soporte en todos estos años.

A mi hermano Miguel quien estuvo pendiente de mí y me ha apoyado en todo lo que deseo para mi vida

También a los docentes que han aportado con mucho conocimiento e información.

A quien pueda hacer uso pertinente de la información brindada en este trabajo.

Genaro Calle



## Abreviaturas y simbología

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**CIV:** Cultivo *in vitro*

**COCs:** Cúmulus ovocitos

**EGF:** Factor de Crecimiento Epidérmico

**FIV:** Fertilización *in vitro*

**HCG:** Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana

**MIV:** Maduración *in vitro*

**OPU:** Aspiración ecoguiada

**PIVE:** Producción de embriones *in vitro*

**SFB:** Suero fetal bovino

**SOF:** Fluido oviductal sintético

**TALP:** Medio de albúmina lactato piruvato de Tyrode

**TCM-199:** Medio de cultivo de tejidos-199 (Tissueculturemedium-199)

**T1:** Medio de tratamiento producido en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (in house 1)

**T2:** Medio de tratamiento producido en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (in house 2)

**T3:** BO-IVM™

# 1 INTRODUCCIÓN

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos han mostrado un progreso anual del 12% en la última década, a tal punto que, en el año 2016 el número de embriones viables producidos *in vitro* superó a los embriones transferibles producidos *in vivo* (Ferré et al., 2020). Este avance está relacionado en parte a la mejora continua de los medios utilizados en las tres etapas de la producción de embriones *in vitro*: maduración, fecundación y cultivo (García et al., 2007)

Inicialmente se utilizaron medios monocultivo para cada una de las tres etapas de la PIVE (Lane & Gardner, 2000). Sin embargo, con el avance en el conocimiento de los requerimientos de los embriones en cada una de las fases de desarrollo se formularon medios de cultivo secuenciales (Thompson et al., 1998). Esto ha permitido que luego de 24 horas de maduración *in vitro* el 85% de los ovocitos lleguen a metafase II y que la fecundación *in vitro* proporcione un 70% de ovocitos fertilizados (Mucci et al., 2006).

Estos resultados en la PIVE han impulsado para que los medios actuales de maduración (MIV), fecundación (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV) sean de fabricación comercial; es decir, fórmulas testadas que se encuentran patentadas y que, si bien estos medios se encuentran disponibles en el mercado, sus fórmulas en gran parte son desconocidas (Stroebech et al., 2015). Sin embargo, los altos costos que conlleva el uso de estos medios, sumado a las restricciones y aranceles de importación en algunos países; así como las condiciones y tiempos de almacenamiento de los medios una vez que se abren encarecen el producto final (embrión producido), estas particularidades llevaron a que varios laboratorios de investigación comiencen a fabricar y estandarizar sus propios medios de MIV, FIV y CIV (Palasz & de la Fuente, 2008).

La mayoría de estos medios de fabricación casera, contienen dentro de sus fórmulas compuestos comerciales como el TCM 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), o el lactato sódico, albúmina, medio Tyrode modificado y Piruvato (TALP) (Parrish, 2014) y el SOF (Holm et al., 1999), además, soluciones salinas equilibradas (sales de Earle para M199), bicarbonato de sodio, aminoácidos esencial y no esencial, L -glutamina, fosfatasa, piruvato, antibióticos, vitaminas, EDTA, azúcar (fructosa o glucosa) y otros factores antioxidantes (Gardner, 2008).

La investigación de Salgado et al. (2013) analiza la maduración de ovocitos bovinos cultivados *in vitro* mediante el medio de maduración a base de TCM 199 suplementado con piruvato de sodio,  $17 \beta$  estradiol y gentamicina, y establecieron cuatro tratamientos de forma aleatoria: T1: Control sin EGF; T2: control más 1ng de EGF; T3: control más de 10 ng de EGF y T4: Control más de 50 ng de EGF. Los resultados indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), al encontrar mayor proporción de ovocitos en estado de metafase II (73%) en la concentración de 50ng/ml, luego de 10ng/ml (54,2%) y 1 ng/ml (32,2%). El grupo control y el suplemento con 50ng/ml EGF no mostraron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ).

González (2012), empleó una comparación entre dos tratamientos, uno que incluye TCM 199, correspondiente en el presente estudio a los grupos in house 1 y 2, y el método Ham's-F-12, obteniendo en el grupo TCM, un valor mayor en el grado 1 (76,9%), así como en el grado 2 (67,4%), pero en el grado 3, el porcentaje es inferior 57,9% en relación a in house 1 y 2.

En cuanto a los procesos de fertilización, el estudio de Vélez et al. (2017) para la producción de embriones *in vitro* emplea para la maduración *in vitro* en medio TCM199 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 0,2 mM de piruvato de Na, 50  $\mu$ g/ml de gentamicina, 0,5  $\mu$ g/ml FSH y 5  $\mu$ g/ml LH y para la fertilización semen congelado de un toro suplementado 20 mM de HEPES y cultivados en gotas de 100  $\mu$ l en medio mSOF suplementado con 50  $\mu$ l de gentamicina y 5 % de SFB sin HEPES. Se clasificaron los COC obtenidos acorde en ovocitos tipo I y tipo II, se obtuvieron como tasa de clivaje  $88 \pm 4$  % y  $89 \pm 8$  % y tasa de blastocistos  $36 \pm 7$  % y  $33 \pm 8$  % respectivamente. No se halló diferencias estadísticas dada la similar capacidad de desarrollo embrionario.

Además, se han elaborado medios no definidos que contienen suero fetal bovino "SFB"; así como medios semidefinidos que omiten el suero y son reemplazados con albumina sérica bovina "BSA" (Romero, 2019) y los definidos libres de proteínas donde BSA o SFB han sido sustituidos por macromoléculas como polivinilpirrolidona o polivinil alcohol; sin embargo, no se obtuvieron mejores tasas de blastocistos, preñeces y terneros nacidos vivos comparado con los porcentajes proporcionados al utilizar medios indefinidos o semidefinidos (Gonella et al., 2013).

Se ha llegado a la conclusión que los medios de maduración comerciales (ejm., BO-IVM) proporcionan resultados similares de maduración (50,6%) comparado con los medios de elaboración casera (47,3%) (Sithole et al., 2021). Iguales resultados fueron obtenidos al comparar medios de FIV comerciales IVF-M199 frente a medios de fabricación casera en cuanto al clivaje (Nedambale et al., 2006).

Por lo antes expuesto, y considerando que la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca tiene un laboratorio de producción de embriones *in vitro*, es necesario contar con un medio de maduración, basado en TCM 199 y SFB; así como, disponer de un medio de FIV, que contenga BSA y Piruvato de Sodio como elementos principales.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1.1 General

Valorar la eficiencia de tres protocolos de maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos, mediante la utilización de dos medios producidos en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (in house 1 y 2), frente a medios comerciales.

### 2.1.2 Específicos

- Determinar la eficiencia de la maduración *in vitro* al utilizar tres protocolos diferentes, dos de ellos a base de medios de elaboración casera (in house 1 y 2), y un comercial, en ovocitos de bovinos obtenidos de ovarios de matadero.
- Evaluar el porcentaje de fecundación *in vitro* al utilizar tres protocolos diferentes, dos con medios de elaboración casera (in house 1 y 2) y un comercial.

### 3 REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Producción in vitro de embriones Bovinos

La producción de embriones *in vitro* (PIVE) y el sexado, forman parte de la tercera generación biotecnológica de la reproducción asistida (Condori et al., 2019). El primer nacimiento de un ternero *in vitro* fue en 1970 y en 1980 se produjo un ternero a través de la fertilización *in vitro*, con pesos de 45 Kg y sin alteraciones aparentes, lo que permitió la mejora de estas biotecnologías y en la actualidad se sigue aplicando satisfactoriamente estas biotécnicas (Sánchez, 2018).

La mayoría de los embriones producidos *in vitro* son transferidos en fresco, a consecuencia de la complejidad de las técnicas de criopreservación. Una de las grandes ventajas de dicho método es que las hembras no necesitan la inducción de hormonas u otro medicamento, además se podría conseguir una mayor descendencia en cortos periodos de tiempo, atribuible a la obtención de ovocitos de terneras, animales preñados, viejos e incluso terneras lactantes (Ynsaurrale et al., 2019).

La técnica antes mencionada, permite generar embriones en laboratorio, recuperando los ovocitos de las hembras mediante aspiración ecoguiada (OPU) o a través de la obtención de ovarios en mataderos, se incuba alrededor de 7 días posteriores a la fecundación, para luego ser transferidos a las hembras receptoras (Colazo & Mapletoft, 2007).

#### 3.2 Métodos empleados para la recolección de ovocitos

##### 3.2.1 Recolección y transporte de ovarios desde el matadero

La recolección de ovarios en el matadero se ejecuta a través de la intervención del recolector al inicio de la cadena de matanza (Giovambattista & Peral García, 2010).

El transporte de los ovarios al laboratorio, corresponde a un procedimiento posterior en el lapso de 30 minutos luego de la recolección, de modo que existen dos medios para el mantenimiento de los ovarios en la recuperación en el matadero y el respectivo transporte (Palomino, 2000).

Los ovarios son transportados en un termo con solución PBS o en solución salina a temperatura ambiente, aunque pueden ser conservados entre 20 a 25°C durante un periodo de 6 a 7 horas, sin afectar su capacidad a posterior (Fernández et al., 2007).

Cabe señalar que los embriones se generan de los ovocitos recuperados de ovarios de vacas derivadas de mataderos, siendo así que, por cada vaca se logrará obtener aproximadamente de 15 a 20 óvulos de los cuales, 4 a 6 embriones podrán ser transferidos (Ferré et al., 2020).

### **1.1.1 Aspiración folicular**

La obtención de los ovocitos se realiza a través de aspiración de folículos entre 2-8mm en los animales en vivo (García et al., 2007). Para llevar a cabo dicho procedimiento, se emplea una aguja calibre 18 conectada a un tubo de 50 ml esterilizado y este se conecta a una bomba de vacío a 50-53mm/Hg. Posteriormente, el contenido aspirado es lavado y filtrado para la recolección, selección y conteo de los ovocitos, para luego proceder con su clasificación (Sánchez, 2018).

## **1.2 Búsqueda y clasificación de COC's**

### **1.2.1 Búsqueda**

Para la búsqueda de ovocitos se utiliza un proceso semejante al de los embriones, a través del uso de una lupa estereoscópica de 30X, la morfología del citoplasma y las células del cúmulo son los indicadores idóneos para determinar el potencial de maduración y fecundación *in vitro* del ovocito (Condori et al., 2019).

### **1.2.2 Clasificación según la calidad de ovocitos**

Una etapa esencial para el procedimiento de PIVE, es la selección de ovocitos de idónea calidad con el fin de garantizar una adecuada sobrevivencia. Se puede clasificar a los ovocitos de acuerdo al número de capas de células del cúmulo y su apariencia del citoplasma (Zárate, 2006). No obstante, Martínez, (2013) propone la siguiente clasificación de los ovocitos:

**Tipo A** Es un ovocito inmaduro, las células del cúmulo tienen un número de capas múltiples y compactas (mayor a 4), poseen un citoplasma homogéneo y transparente.

**Tipo B** Es un ovocito inmaduro, posee múltiples capas de cúmulus (1 a 3), su citoplasma es homogéneo con zonas periféricas oscuras.

**Tipo C** Ovocito inmaduro, caracterizado por su cúmulus denudado con un citoplasma irregular con zonas oscuras.

**Tipo D** Ovocito maduro, posee un cúmulus con células expandidas, citoplasma irregular y con zonas oscuras.

### **1.3 Etapas para la PIVE de embriones bovinos**

La PIVE ha empezado a tomar relevancia no solo por el nivel investigativo, sino también porque la comercialización ha tomado auge en los últimos tiempos. Por ello, es importante que la producción *in vitro* y sus resultados sean eficaces. Es así que, Mucci et al., (2006) señalan el proceso para la PIVE de embriones compuesto de 3 etapas ordenadas cronológicamente, independientemente del protocolo que se esté empleando, se dividen en: 1) Maduración de ovocitos, 2) Fecundación de ovocitos y 3) Cultivo de embriones. Los pasos antes mencionados tienen implicaciones fisiológicas complejas, dado que la siguiente fase depende del éxito del anterior y sucesivamente.

#### **1.3.1 Maduración de ovocitos**

La maduración de ovocitos incluye cambios nucleares y citoplasmáticos. La maduración nuclear es la progresión de la meiosis desde la etapa de profase en la primera división meiótica a la metafase en la segunda división en el momento de la ovulación. La meiosis se detiene en meiosis II (MII) hasta que se dé la fertilización, luego ésta se reanuda y completa la segregación del segundo corpúsculo polar. La MIV usualmente se desarrolla en una atmósfera con baja cantidad de oxígeno (20%), ésta es una situación que difiere en gran medida a la que existe en el interior del tracto genital, en los folículos ováricos, oviducto y útero donde existe un aproximado de 1,5 a 8% de oxígeno (García et al., 2007).

Los ovocitos inmaduros cultivados que alcanzan MIII al final de la MIV son del 85 al 90%, su maduración nuclear a MII normalmente se da en un rango de 20 a 24 horas y luego estarán listos para la fertilización (Ferré et al., 2020).

Es importante mencionar que la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos puede ser afectada por factor tiempo, la temperatura de transporte del matadero al laboratorio,

---



tamaño del folículo, etapa de desarrollo del ovocito y su diámetro, tiempo de maduración, las hormonas e incluso los sueros utilizados. Un período de tiempo inadecuado de maduración puede conllevar a una formación anormal de cromatina y comprometer el proceso que se está desarrollando (Landínez et al., 2010).

### **1.3.2 Fecundación de ovocitos**

La fecundación de ovocitos es un proceso de capacitación en el que el gameto sufre una serie de acontecimientos que lo llevan a la hiperactivación y reacción acrosómica, etapas muy importantes para la penetración espermática a la zona pelúcida, continuando con la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito (Condori et al., 2019).

La capacitación espermática se ejecuta exponiendo los espermatozoides vivos a concentraciones de heparina y cafeína, para estimular el proceso de capacitación espermática preparándolos para la posterior interacción y fecundación del óvulo (Fernández et al., 2007).

La capacitación espermática en la especie bovina es favorecida con la incorporación de heparina al medio y para lograr resultados óptimos, es relevante e indispensable ajustar la concentración de heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado (García et al., 2007).

### **1.3.3 Cultivo de embriones**

El cultivo de embriones es la tercera etapa del PIVE, tiene como finalidad permitir el desarrollo de los ovocitos previamente fertilizados hasta alcanzar el estadio embrionario, para ser transferidos a la parte receptora (Gonella et al., 2013).

El cultivo de embriones es la fase en la que se forman estructuras desde previos cigotos hasta llegar a los blastocitos. Este proceso dura entre 1 y 7 días del desarrollo del embrión. Dicho cultivo se puede realizar mediante distintas características como soporte, presencia o no de aceite mineral, medios simples definidos, semidefinidos, indefinidos, entre otros, y tomando en cuenta los tipos de células (Salgado & Lopera, 2020).

Los embriones de 2 a 4 células o más, resultado de la FIV, se deben cambiar de medio de fecundación a otro medio de cultivo embrionario para que los embriones continúen

con su división celular a 8, 16, y 32 células hasta llegar a mórulas (Fernández et al., 2007). Luego de la formación de la mórula se logra diferenciar en el embrión dos tipos celulares: las células de la masa celular interna que darán origen al feto y las células del embrioblasto forman una parte del corion y estarán en contacto directo con el útero luego de su eclosión y durante la implantación (Gonella et al., 2013).

En animales domésticos se da la compactación de las blastómeras. Se forma una única masa celular interna esencial para la formación del trofoblasto y el embrioblasto, alcanzando la primera diferenciación celular (Peippo et al., 2011).

La eficiencia de un sistema de cultivo embrionario *in vitro* se mide a través del porcentaje de formación del blastocisto; los que se desarrollan más rápido son considerados viables e idóneos y con mayor capacidad para sobrevivir después de la crioconservación (Condori et al., 2019).

#### **1.4 Medios utilizados para PIVE**

##### **1.4.1 Medios comerciales**

###### **1.4.1.1 Medio de Maduración BO-HEPES-IVM™ (IVF Bioscience)**

Es una fórmula patentada y según su fabricante no posee suero. Está complementada con baja cantidad de glucosa, hormonas gonadotróficas y gentamicina. Es adecuado para una maduración en platos y microgotas y sobre todo es el medio más óptimo para la maduración *in vitro* de ovocitos en laboratorio (IVF Bioscience, 2017).

En el estudio de Sithole et al., (2021) se compararon dos medios de maduración (TCM-199 y BO-IVM) y se evaluó la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos. Se empleó 500 ul de TCM-199 suplementada con SFB al 10%, FSH, LH y E2 y para el otro medio se usó 500 ul de BO-IVM de la casa comercial IVF Bioscience. La investigación tuvo resultados TCM-199 ( $50,6 \pm 13,9$ ) y BO-IVM ( $47,3 \pm 13,7$ ). Concluyendo que en los dos medios no difirieron la tasa de maduración, por lo tanto, los dos medios de maduración pueden ser utilizados para la MIV de ovocitos bovinos dando resultados exitosos.

###### **1.4.1.2 Medio de fertilización BO-IVF™ comercial (IVF Bioscience)**

Al igual que el anterior, este medio de fertilización es patentado y de acuerdo al fabricante no posee suero. Está complementado con heparina, gentamicina y

enriquecido con una solución PHE para la capacitación espermática y formación nuclear, con el objetivo de mejorar el desarrollo embrionario (IVF Bioscience, 2017).

#### **1.4.2 Medios de maduración *in vitro* de fabricación en laboratorio “in house”.**

##### **Utilización de SFB, HCG y EGF en medios de maduración *in vitro***

###### **1.4.2.1 Suero Fetal Bovino (SFB)**

El suero fetal bovino se ha convertido en el producto biológico más empleado para el mantenimiento de cultivos de ovocitos por su variedad de nutrientes (aminoácidos, factores de crecimiento, vitaminas y sustratos energéticos), al ser aplicado correctamente brinda resultados satisfactorios en cuanto a la proliferación y adhesión celular (Simancas et al., 2018).

El Suero fetal bovino es una de las sustancias que aumenta favorablemente el porcentaje de ovocitos maduros obtenidos (Van-Der Valk et al., 2018). Así como también, posee un efecto bifásico sobre los embriones al inhabilitar las divisiones celulares tempranas, pero a su vez, acelera el desarrollo hacia estadios posteriores (Ferré et al., 2020). En cambio, con suplementación del 20% de SFB al medio TCM-199 en búfalos, hubo una maduración del 83% de ovocitos. Esto puede deberse a los factores de crecimiento, nutrientes y antioxidantes que se encuentran en este medio (Puri et al., 2015).

###### **1.4.2.2 Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG)**

La hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) es una hormona glicoprotéica, formada por una masa de 39,5 kDA, simplificada por tejido trofoblástico. En el embarazo se producen pocas células malignas debido a la presencia del embrión en crecimiento, después de la fecundación y luego por la placenta (Melchor et al., 2019). Dicha hormona suele emplearse para mejorar la función del cuerpo lúteo y la productividad de las vacas (López, 2020).

En la investigación de Abdel-Wahab et al., (2018), los COC's se lavaron dos veces en medio TCM-199 suplementado con 10% SFB, 50µg/ml de sulfato de gentamicina y 5µl/ml L-glutamina y se traslada a 50µl de medio de maduración suplementado con 0,2 UI de suero de cerda preñada, hGC (gonadotropina coriónica humana) a razón de 2,0 UI (Pregnuil, Intervet), 1,0 estradiol. La adición de hormonas conserva el porcentaje de

ovocitos que alcanzan la metafase II (Simancas et al., 2018). La maduración ovocitaria se obtuvo con 1 µg/ml de FSH, estrógenos y HGC, pero no aumentaron el número de ovocitos de MII (Bahrami et al., 2019).

#### **1.4.2.3 Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)**

El factor de crecimiento epidérmico o EGF es una proteína que propicia el incremento y la diferenciación celular en conjunto con el receptor EGFR. En fertilizaciones *in vitro* de animales, especialmente en embriones bovinos produce una división y desarrollo hasta blastocisto, semejante al que se obtiene con el suero fetal bovino, convirtiéndose en una alternativa idónea para el mejoramiento embrionario (Rivera, 2018).

Salgado et al., (2013) en su investigación exponen que al dejar a los ovocitos madurar empleando 10 ng/ml de EGF muestra un rango significativamente alto de clivaje, así como el estadio de cuatro a ocho células. Concluyen que se puede fertilizar normalmente teniendo en cuenta le EGF que permitirá alcanzar el estadio de 8 células.

Por otra parte, el estudio realizado por Luo et al., (2020) indica que el factor de crecimiento epidérmico favorece la proliferación de las células de la granulosa y sobre todo la maduración de los ovocitos, además de intervenir en el crecimiento folicular como luteal.

### **1.5 Pruebas para determinar maduración nuclear**

La maduración nuclear involucra aspectos de condensación del material nuclear y la forma de los cromosomas mediante ciclos meióticos y maduración del citoplasma, interviniendo en las organelas y maduración (Espin, 2018).

Es un proceso que tiene una duración de 20 a 24 horas en el que el ovocito atraviesa por la primera división meiótica, producto de la expulsión del corpúsculo polar inicial en el espacio perivitelino, denominándose ovocito secundario. Posteriormente, comienza la segunda división meiótica hasta alcanzar la metafase I. Para que se dé la segunda división meiótica es necesario que el espermatozoide penetre el óvulo, mismo que va acompañado por el segundo corpúsculo en el espacio perivitelino. Cabe mencionar que en esta fase el ovocito tiene el número de cromosomas relacionado con las células sexuales (Carazas & Ayala, 2019).

Desempeñan un papel importante al momento de determinar la maduración nuclear de ovocitos bovinos, las fosfodiesterasas tipo 4, que disminuyen las concentraciones de AMPc, activando factores de transcripción que posteriormente van a reactivar la meiosis (Carrillo et al., 2021).

Para realizar una evaluación continua de la meiosis luego de la maduración de los COC's, es importante observar mediante una lupa estereoscópica la dilatación de las células del cúmulo formado, así como también, el grado de mucosidad, para luego colocarlos alrededor de 10 minutos al fluorocromo Hoechst en concentraciones de 1 µg/ml. Este elemento muestra el estado en el que se encuentran los ovocitos, es decir, estado de vesícula, ruptura de la misma o en metafase I, anafase-telofase I o metafase II (primer corpúsculo polar extruido). Por otra parte, también se puede analizar mediante el microscopio de epifluorescencia en conjunto de un filtro con una capacidad de leer la intensidad del fluorocromo Hoechst (emisión a 352 nm y excitación a 455 nm) (Tarazona et al., 2014).

## **1.6 Evaluación de fertilidad**

Para determinar la fertilidad post FIV, se desarrolló técnicas para evaluar el desarrollo embrionario (DIV) (Robledo et al., 2009). Se valora el desarrollo y morfología de embriones a los 2,4,5,6 días posteriores a la FIV, y finalmente la tasa de producción embrionaria se estandarizó al día 8 post-FIV (Robledo et al., 2009). El porcentaje de fertilización está dado por el rango de clivaje a las 48 horas luego de la inseminación (asumiendo que no hay partenogénesis). Los rangos recomendados deberían estar entre 70-80% con semen convencional (Ferré et al., 2020).

Sin embargo, se han desarrollado varias pruebas que permitan analizar la calidad del esperma y fertilización *in vitro* de los bovinos. Entre ellas está el perfil transcriptómico del espermatozoide dado que brinda información sobre la espermatogénesis, función del espermatozoide y funciones paternas a posteriori de la fertilización. Para ello, se toma en cuenta los transcritos bovinos BSP3 y SPATA18 vinculados con el desarrollo de células germinales y la conservación de la cromatina en el proceso de espermatogénesis, así como también transcritos relacionados con el desarrollo de la placenta (Selvaraju et al., 2018).

Para realizar un análisis de las funciones espermáticas se puede recurrir a la tinción de fluorocromos. Bucher et al., (2019) manifiestan que la funcionalidad de los

---

espermatozoides bovinos crío preservados es mediante citometría de flujo multicolor a través de fluorocromos tales como: violeta de calceína, yoduro de propidio, lectina de *Arachis*, Fluo-4 y colorante de cianina. Se analizó la esterasa espermática, la integridad de la membrana plasmática, el acrosoma intracelular y potencial de membrana mitocondrial, mismos que se convirtieron en predictores de la fertilidad del toro posterior a la inseminación artificial.

De igual forma, Avilés, (2011) manifiesta que para analizar los datos obtenidos de la fertilización *in vitro*, entre las 18 y 20 horas posterior a la inseminación, se coloca a los ovocitos en glutaraldehído al 0,5% en PBS al 10%, y puestos en incubación mediante la solución de Hoechst (1mg/ml). Luego de la tinción es necesario realizar una evaluación de los ovocitos a través de la observación en el microscopio de la fluorescencia Nikon eclipse E200 con luz ultravioleta de excitación 340-380 nm y emisión 435-485nm. En esta fase se debe tomar en cuenta el estadio nuclear del ovocito, si se encuentra en vesícula germinal, metafase y pronúcleo, así como también, la existencia o no de espermatozoides y la fase en la que se encuentran.

De acuerdo Zárate, (2006) a un lapso de tiempo de 24 horas es necesario para el cumplimiento de la maduración nuclear por parte del ovocito, para que llegue al estadio de MII hasta su fertilización y alcance la formación de los pronúcleos. Además, una vez transcurrido el tiempo de MIV, los COC´S tiene contacto con los espermatozoides para la fertilización *in vitro*, cuyo evento fisiológico corresponde a la capacitación y penetración de espermatozoides sumado a la unión de gametos para la formación de pronúcleos, por lo que se requiere la selección de espermatozoides con mejores características y condiciones (Liu et al., 2013).

Entre las técnicas de selección espermática se encuentran las de migración, Swim-Up (Liu et al., 2013), además de lavado selectivo de las subpoblaciones mediante centrifugación de gradientes de densidad sea Percoll y Bovipure (Samardzija et al., 2006).

Luego de la selección espermática se procede con la determinación de la concentración, permitiendo identificar la cantidad de espermatozoides necesarios para colocarlos en los ovocitos maduros. El conteo se realiza a través de hemocitómetro o cámara de Thoma, sumado al ajuste de dosis que van entre 1 y  $6 \times 10^6$  espermatozoides/ml, de acuerdo al protocolo a emplearse. Después de la adición de los espermatozoides en el

medio de fertilización con los óvulos ubicados previamente, se realiza la consolidación de cocultivo con los dos gametos en periodos de 18 y 22 horas en entornos de humedad alta y protegidos de la luz (Salgado & Lopera, 2020).

En cambio, Palma, (2018) menciona que entre las técnicas más empleadas para la selección de espermatozoides corresponde a los gradientes de percoll y el lavado espermático. La técnica del lavado se inicia con la separación de los espermatozoides vivos y muertos. Se deposita de 200 a 500 ul de semen en los tubos de centrifuga en un medio de 1 y 2 ml del medio sperm-talp. Se continúa con la incubación en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y en una temperatura de 39 y 45°C alrededor de 1 hora (Gonella et al., 2013).

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Materiales Biológicos

- Ovarios de vaca
- Ovocitos
- Semen criopreservado

#### 4.1.2 Materiales Químicos

- Solución fisiológica
- Alcohol 70%
- Medios de maduración y fertilización comercial IVF Bioscience™ (IVF Ltd, United Kingdom)
- Reactivos para preparar medio de maduración (in house 1): TCM 199 (M4503), Suero fetal bovino (SFB, F2442), Gentamicina (G1264), EGF (E4127), Piruvato de Sodio (P5280), L-Glutamina (G8540), Estradiol (E2758), Cisteamina (M9768), FSH-p (Folltropin, Vetoquinol).
- Reactivos para preparar medio de maduración (in house 2): TCM 199 – Earles Salt, Suero fetal bovino (SFB), Piruvato de Sodio (P5280), FSH, LH (Churulon), Amicacina, Estradiol y HCG (Churulon).
- Reactivos para preparar medio de fecundación 1: Albúmina Sérica Bovina (BSA, A9418), FTALP, Piruvato de sodio, PHE (P4126), Heparina (H0200000), Amicacina (Normon)
- Reactivos para preparar medio de fecundación 2: Albúmina Sérica Bovina (BSA), Piruvato de Sodio, Cloruro de Sodio (S5886), Cloruro de Potasio (P5405), Fosfato de sodio monobásico (P0662), Bicarbonato de sodio (M8266), Gentamicina (G1264), Fructosa, Cloruro de calcio (C5670), Lactato de Sodio (L4263), MEM, H2O (Embryo tested) csp y Rojo fenol (P3532).

#### 4.1.3 Materiales de Laboratorio

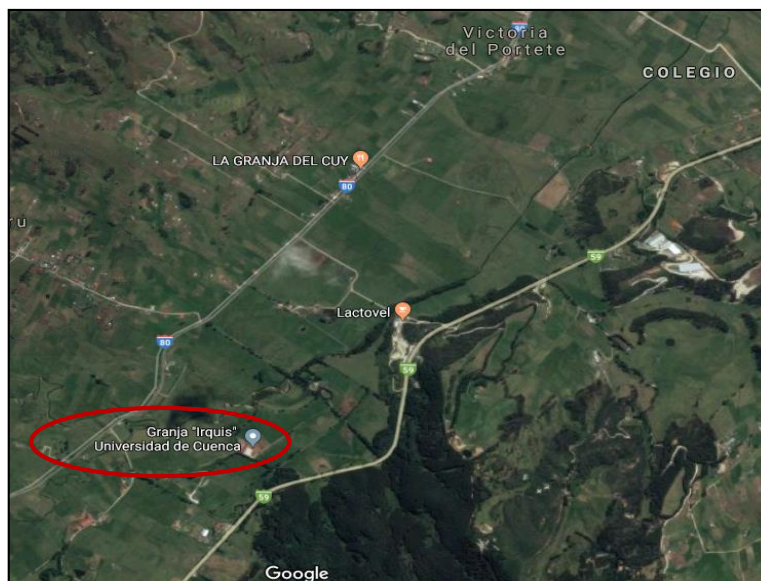
- Pipetas automáticas
- Placas Petri con cuadrículado



- Estéreo microscopio (Microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de luz con lámpara de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.)
- Filtros de 0,22 micras
- Baño María
- Platina de calefacción
- Estufa de CO<sub>2</sub>
- Cámara de flujo laminar

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Área de estudio



**Figura 1:** Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis, parroquia Victoria del Portete.

**Fuente:** Directorio cartográfico de Google Maps, 2018.

#### 4.2.1.1 Lugar de la investigación

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca ubicada en la Granja de Irquis, área que se encuentra en la jurisdicción política de la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia Victoria del Portete, cuyas coordenadas son Latitud sur: 4'48.34"S y Longitud Oeste 79° 4'30.12"O. El laboratorio

está ubicado a una altitud de 2671 m.s.n.m. y en el lugar la pluviosidad anual se encuentra entre 800 mm y 2000 mm, humedad relativa del 80% y temperaturas que oscilan entre 7 y 12°C respectivamente.

## 4.2.2 Preparación de medios

### 4.2.2.1 Experimento 1

Se comparó tres protocolos de maduración que contienen dos medios de maduración in house (caseros), y uno comercial, los cuales se detallan a continuación:

**Tabla 1:** Medio de maduración “in house 1=T1”

Reactivo	Concentración	Cantidad
TCM-199	-	84000 µl
SFB	10% v/v	1000 µl
Piruvato de Sodio	0,022 mg/ml	50 µl
Estradiol	1 ug/ml	10 µl
FSH (Folltropin)	0,02 mg/ml	10 µl
Gentamicina	50 ug/ml	50 µl
EGF	30 ng/ml	60 µl
L-Glutamina	20 mM/ml	100 µl
Cisteamina	0,1 mM/ml	77 µl

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 2:** Medio de maduración “in house 2=T2”

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>
TCM-199	-	9000 µl
SFB	10% v/v	1000 µl
Piruvato de Sodio	0,022 mg/ml	20 µl
Estradiol	1 ug/ml	10 µl
Folltropin	0,02 mg/ml	10 µl
HCG	1000 UI/ml	2 UI
LH	5 mg/ml	100 µl
Amicacina	0,42 mg/ml	50 µl

**Fuente:** Elaboración propia

#### **4.2.2.2 Medio de maduración comercial (BO-IVM™=T3)**

En el experimento 1 se utilizó como testigo el medio comercial de maduración de la empresa BO-IVM™; lugar de origen Bickland Industrial Park, Falmouth, Cornualles en el Reino Unido, código TR11 4TA. Brevemente, según el fabricante el medio no contiene suero fetal bovino (SFB), posee baja cantidad de glucosa, hormonas gonadotrópicas y gentamicina. Es adecuado para la maduración en pocillos y microgotas.

#### **4.2.3 Experimento 2**

En este ensayo se valoró tres protocolos de fecundación que contienen dos medios de FIV in house (caseros), y uno comercial, los cuales se detallan a continuación:

**Tabla 3:** Medio de fecundación “in house 1=T1”

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>
Agua ultra pura	5,549 mg/ml	125000 µl
Cloruro de Sodio	8500 mM/ml	70,1 mg
Cloruro de Potasio	3350 mM/ml	3 mg
Fosfato de Sodio Monobásico	183,70 mM/ml	0,5 mg
Bicarbonato de Sodio	290 mM/ml	26,3 mg
Cloruro de Magnesio	2.32 g/mL	1,3 mg
Cloruro de Calcio	901,06 mM/ml	3,7 mg
Lactato de Sodio	0,89 mg/ml	22,4 µl

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 4:** Suplemento 1 para 4ml

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>
BSA	7,57 mM/ml	24 mg
Piruvato de Sodio	0,022 mg/ml	40 µl
PHE	312 m/l	176 µl
Heparina	10 µg/ml	40 µl
Gentamicina	50 ug/ml	14 µl

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 5:** Medio de fecundación “in house 2=T2”

---

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>
Agua ultra pura	5,549 mg/ml	20000 µl
Cloruro de Sodio	8500 mM/ml	133,2 mg
Cloruro de Potasio	3350 mM/ml	4,6 mg
Cloruro de Magnesio	2.32 g/mL	2 mg
Bicarbonato de Sodio	290 mM/ml	42 mg
Fosfato de Potasio	183,70 mM/ml	0,48 mg
Cloruro de Calcio	901,06 mM/ml	6 mg
Lactato de Sodio	0,89 mg/ml	33,6 mg
Rojo fenol	14,10v	0,1 mg

---

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 6:** Suplemento 2 para 4 ml

---

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Cantidad</b>
BSA	7,57 mM/ml	24 mg
Piruvato de Sodio	0,022 mg/ml	8 µl
PHE	312 m/l	176 µl
Heparina	10 µg/ml	44 µl
Amicacina	0,42 mg/ml	20 µl

---

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 7:** Sperm Talp 5 ml

Reactivo	Concentración	Cantidad
BSA	7,57 mM/ml	30 mg
Piruvato de Sodio	0,022 mg/ml	263 µl
Gentamicina	50 ug/ml	25 µl

**Fuente:** Elaboración propia

#### 4.2.4 Medio de fecundación comercial (IVF-Bioscience=T3)

Los medios IVF Bioscience son testados y a decir del fabricante no contiene suero fetal bovino (SFB) y esta complementado con Heparina y Gentamicina. El protocolo de esta casa comercial envía junto al medio de fecundación un medio de preparación de semen BO-SemenPrep™, lugar de origen Bickland Industrial Park, Falmouth, Cornualles en el Reino Unido, código TR11 4TA este se utiliza para el lavado de espermatozoides antes de la fertilización *in vitro*.

**Tabla 8:** Medio de lavado de ovocitos

Reactivo	Concentración	Cantidad
H-SOF	-	9 ML
SFB	10% v/v	1 ml
Piruvato de Sodio	0,022 mg/ml	20 ul
Amicacina	0,42 mg/ml	50 ul

**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 9:** Medio de Tinción Fluorescente

Reactivo	Empleo	Concentración
H-SOF	Lavado	-
Glutaraldehído	Fijado	0,5%
Hoechst Stain	Fluorocromo de ADN	1 µg/ml
Medio de Montaje	Montaje de Muestras	10 µl

**Fuente:** Elaboración propia

#### 4.2.5 Preparación del medio de montaje

Se mezcló 6,25 ml de PBS + 6,25 ml de glicerol (Sigma G-5150) + 6,25 µl de solución madre de Hoechst. Luego se conservó en oscuridad a 4°C hasta su uso (se puede conservar varios meses).

#### 4.3 Diseño Experimental

El estudio contempla dos experimentos:

##### 4.3.1 Experimento 1

Se determinó la eficiencia de tres protocolos de maduración *in vitro*, en dos de ellos se utilizó medios de maduración elaborados en el laboratorio, a los cuales se les determinó “in house 1=T1”; “in house 2=T2”, y un medio comercial “BO-IVM™= T3”.

En cada sesión del 100% de los COC´s clasificados como aptos para la producción de embriones *in vitro*, de acuerdo a lo descrito por Ayala et al. (2020) se dividió en tres partes iguales y se colocó en uno de los tratamientos al azar (T1; T2 y T3), las 7 sesiones fueron repetidas hasta completar 200 COC´s por cada tratamiento.

La eficiencia de los protocolos de MIV fueron valoradas en base a las siguientes variables dependientes:

- Grado de expansión de las células del cúmulus, 24 horas pos-maduración *in vitro* (Machado et al., 2015)

- Número de COC´s con núcleo en metafase II, 24 horas pos-maduración *in vitro*.

Una vez determinado el protocolo que proporcionó mejores resultados de maduración *in vitro* (in house 1), se procedió a iniciar con el segundo experimento.

### **4.3.2 Experimento 2**

Se buscó evaluar el porcentaje de fecundación *in vitro* al utilizar tres protocolos de fecundación, dos de los cuales fueron de elaboración casera: “in house” 1=T1”; “in house” 2=T2” y uno de procedencia comercial “IVF-Bioscience=T3”.

En cada sesión el 100% de los COC´s clasificados como aptos para la producción de embriones *in vitro*, de acuerdo a lo descrito por Ayala et al. (2020) fue dividido en tres partes iguales y se colocó en medio de maduración in house 1, del experimento 1.

A las 24 horas pos-MIV se procedió a valorar el grado de expansión de las células del cúmulus y únicamente los COC´s con células del cúmulus expandidas fueron empleadas para ingresar al experimento 2. Estos COC´s se repartieron en partes iguales en T1; T2 y T3. Las sesiones fueron repetidas hasta completar 200 COC´s por tratamiento.

La eficiencia de los protocolos de FIV se valoró en base a las siguientes variables:

- 1) Número de ovocitos que presentan pronúcleo masculino y femenino.

## **4.4 Metodología para la Investigación experimental**

### **4.4.1.1 Recolección de ovarios**

Los ovarios se recolectaron del Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP) dos veces por semana. Estos fueron transportados al laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, ubicado en la Granja Iruquis, en un tiempo no mayor a dos horas en solución fisiológica a temperatura entre 25 - 35°C, con la suplementación de 1ml de gentamicina



#### **4.4.1.2 Recuperación y clasificación de COC´s**

En el laboratorio los tejidos adyacentes a los ovarios (cuernos uterinos, ligamentos, segmentos de oviducto, etc.) fueron removidos con una tijera, cuidando de no romper los folículos de la superficie ovárica. Inmediatamente, se lavó los ovarios con cloruro de sodio al 0,9% estéril, atemperado a 37,5°C, tres veces hasta que el contenido líquido quedará completamente cristalino.

Después del lavado, los ovarios fueron secados con papel absorbente, el cual previamente se empapó con alcohol. Inmediatamente y cuidando la cadena de temperatura, se procedió a la punción de los folículos que miden entre 2-8mm, con aguja de calibre 18G acoplada a una jeringa de 10 ml.

El líquido aspirado se depositó directamente a un tubo Falcón de 15 ml, el cual se mantuvo en placa térmica a 37°C. Una vez que se completó la aspiración folicular, se esperó 15 minutos para que los COC´s (complejos cúmulos ovocitos) se depositen en el fondo del tubo Falcón, para luego aspirarlos con una pipeta Pasteur.

El pellet o sedimento se colocó en una placa de búsqueda de 95 mm<sup>2</sup>, luego se realizó un extendido del líquido folicular en un área aproximada de 3 a 4 cm<sup>2</sup>, para proceder a identificar los COC´s y transferir a gotas de medio H-SOF (fluido oviductal sintético suplementado con Hepes) para su posterior clasificación

#### **4.4.1.3 Clasificación de los COC´s**

La placa con los COC´s fue llevada a un estereoscopio para realizar la búsqueda, selección y clasificación, de acuerdo al criterio descrito por Ayala et al., (2020) quienes agruparon los COC´s en aptos (Tipos A y B) y no aptos (Tipos C y D), brevemente:

- **COC´s aptos:** con células del cúmulus compactas, con más de 5 capas, que rodea total o parcialmente al ovocito, citoplasma homogéneo denso o finamente granuloso.
- **COC´s no aptos:** las células del cúmulus completamente expandidas, u ovocitos completamente desnudados, con citoplasma granular o picnóticos.

Los COC´s fueron lavados tres veces en gotas de 100 µL de medio H-SOF con el fin de librarlos de detritos tisulares, coágulos, etc.

#### **4.4.1.4 Maduración *in vitro* (MIV)**

En el experimento se utilizaron tres protocolos de maduración *in vitro*, dos de ellos con medios caseros (in house 1 y 2) y uno comercial, detallados en la sesión anterior. El proceso de maduración *in vitro* fue realizado en microgotas de 50 µl, las cuales se colocaron en placas Petri de 25 mm. En cada microgota se colocó de 10 a 12 COC's por tratamiento, luego las placas fueron llevadas a la incubadora, la cual tenía las siguientes características: CO<sub>2</sub> al 5%, Humedad del 90% y 38,5°C de temperatura, aquí permanecieron 24 horas.

#### **4.4.1.5 Valoración de la expansión de las células del cúmulus**

Una vez transcurrido 24 horas del proceso de maduración *in vitro*, se observó los COC's bajo un estereoscopio para determinar el grado de expansión de las células del cúmulus de acuerdo a lo descrito por Machado et al., (2015). Brevemente, los COC's se clasificaron en: expansión moderada (grado 1), caracterizada por pocos cambios morfológicos de las células del cúmulus, expansión parcial (grado 2), con células del cúmulus parcialmente expandidas y grado 3 expansión completa o casi completa de las células del cúmulus.

#### **4.4.1.6 Evaluación de la progresión de la meiosis luego de la maduración *in vitro***

Para determinar el estado de maduración nuclear se tomó los COC's de cada tratamiento y fueron colocados en gotas separadas de H-SOF. Luego al medio se adicionó Hialuronidasa (Sigma) en concentración 1 mg/ml (p/v) por dos minutos y se procedió a denudarlos con pipeteo constante, fueron lavados con solución PBS, se colocaron en gluteraldehído por 30 minutos, nuevamente lavados en PBS por 5 minutos, los ovocitos fueron expuestos por 15 minutos al fluorocromo Hoechst 33342, Sigma en una concentración de 1 µg/ml (p/v), se les hizo el ultimo lavado en PBS por 5 minutos, para luego ser montados en un porta objetos y sellados con esmalte transparente.

La progresión meiótica en los ovocitos se evaluó utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 Si se observaba que los ovocitos se encontraban en estado de vesícula germinal (GV) se los consideraría como inmaduros y si se encontraban en metafase II (MII; primer corpúsculo polar) eran clasificados como maduros.

#### **4.4.1.7 Fecundación *in vitro* (FIV)**

Para la fecundación *in vitro* se utilizaron tres protocolos de fecundación *in vitro*, dos con medios caseros (in house 1 y 2) y un comercial (T3).

En el proceso de MIV previo a la fecundación *in vitro*, se empleó el medio de maduración de elaboración casera in house 1. Del 100% de los COC's clasificados como aptos para la MIV se colocaron en microgotas del medio de maduración por 24 horas, luego de las cuales se valoró la expansión de las células del cúmulus y solo aquellas que mostraron expansión total de las células del cúmulus fueron utilizados en la FIV del experimento 2.

El total de los COC's seleccionados en el proceso anterior se lavaron tres veces en el medio de fertilización respectivo (T1; T2; T3) y fueron repartidos al azar en los tres grupos experimentales a razón de 10-12 COC's por cada microgota de 50 µl de medio de fertilización respectivo (T1; T2; T3).

Concomitantemente, se realizó la preparación de los espermatozoides que fueron utilizados para la fecundación *in vitro* (espermatozoides de pajuelas propias del laboratorio). Las pajuelas se descongelaron a 37°C x 45 segundos, luego depositadas en un vial. Para la clasificación de espermatozoides se utilizó columnas de percoll de 30, 60 y 90% en los tratamientos 1 y 2. La inseminación se llevó a cabo añadiendo  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml a cada microgota en los tres tratamientos. Los ovocitos fueron incubados con los espermatozoides durante 24 horas a 38,5°C y 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera de aire humidificado. A continuación, se detallan los medios de fecundación empleados:

Para la preparación de los espermatozoides del tratamiento 3 (Testigo), se utilizó un medio de preparación de semen BO-SemenPrep™, este se empleó para el lavado de espermatozoides antes de la fertilización *in vitro*. A decir del fabricante, conserva la energía de los espermatozoides antes de colocarlos al medio de fertilización, además evita la toxicidad de los gradientes tradicionales y permite que el proceso de centrifugación sea más suave, lo cual reduce en gran medida el daño celular potencial, pues se reduce los pasos que mantienen los procedimientos tradicionales. Se indica que contiene Gentamicina.

#### **4.4.1.8 Determinación del porcentaje de fecundación in vitro**

Los COC's de cada tratamiento fueron colocados en gotas separadas, y se adicionó al medio Hialuronidasa (Sigma) en concentración 1 mg/ml (p/v) por dos minutos, para luego proceder a denudarlos con pipeteo constante.

Una vez separadas las células del cúmulus, los ovocitos fueron expuestos por 2 minutos al fluorocromo Hoechst (33342, Sigma) en una concentración de 1 µg/ml (p/v).

La fecundación se evaluó mediante la presencia de pronúcleos masculino y femenino, esto mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200.

#### **4.5 Análisis estadístico**

Los datos recopilados fueron tabulados en Excel y procesados mediante el paquete estadístico SPSS versión 26. Se determinó estadígrafos principales.

Se empleó la prueba de Chi cuadrado, para determinar la independencia entre el tipo de COC's utilizado (Aptos y no aptos) en los diferentes tratamientos y el grado de expansión de las células del cúmulus (Grado 1, 2 y 3); así como los ovocitos que llegaron a metafase II en el experimento 1. En el experimento 2 igual se utilizó Chi cuadrado para valorar el tipo de COC's utilizado (Aptos y no aptos) con los ovocitos que presentaron pronúcleos

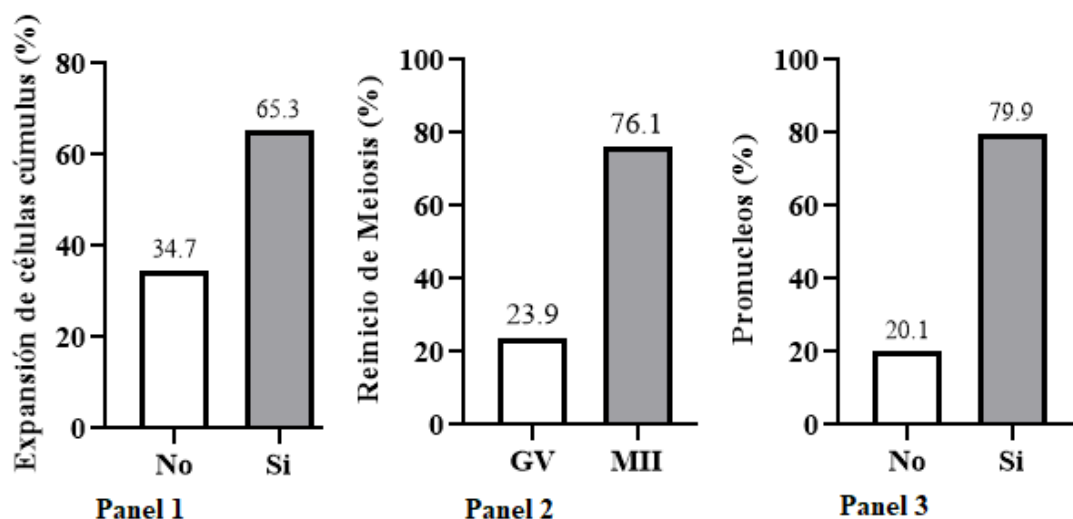
## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Valoración general de la expansión de células cúmulus, progresión de meiosis y pronúcleos

En este apartado se describen los resultados generales del porcentaje de expansión de las células del cúmulus, reinicio de la meiosis como variable de consideración del proceso de maduración del ovocito y la formación de pronúcleos como indicativo de fertilización.

Se parte del análisis de los resultados obtenidos de forma general sin tomar en cuenta los tratamientos para visualizar los datos arrojados posteriores de 24 horas de maduración *in vitro*. Es importante señalar que el análisis en relación a las células expandidas, reinicio de meiosis y pronúcleos acorde a los tratamientos se presenta en apartados posteriores.

Los COC'S que muestran células expandidas entre los tres tratamientos indica un valor de 65,3% (Fig. 2; Panel 1). Además, al realizar el análisis del reinicio de la meiosis se observó que tres de cada cuatro ovocitos llegaron a metafase II (76,1%: Fig. 2; Panel 2). Finalmente, del 100% de los ovocitos que ingresaron a la fecundación *in vitro*, un 79,9% llegaron a presentar pronúcleos 24h pos FIV (Fig. 2; Panel 3).



**Figura 2:** Porcentaje de expansión de las células del cúmulus de los COC's (Panel 1), ovocitos que llegaron a metafase II (Panel 2) y ovocitos que presentaron pronúcleos (Panel 3) posterior de la FIV. Considerando el total de ovocitos valorados sin considerar tratamientos.

Los resultados obtenidos en relación al grado de expansión de células del cúmulus en el presente trabajo fueron mayores de los reportados por Bóez et al., (2008), quienes determinaron que un 61,4%, de COC´s aptos llegaron a expandir sus células, y en grado 3 (no aptos) obtuvieron porcentajes de 65,3%. Sin embargo, son menores a los descritos (76,9%) por Fernández et al., (2007) y a los de Martínez, (2013) quienes establecieron porcentajes de expansión del 90% en COC´s aptos. En los tres estudios se observa que la presencia de células del cúmulus en gran proporción (COC´s aptos) durante la fase de maduración *in vitro* es fundamental, ya que colabora con la adición de factores que mejoran el proceso de maduración nuclear y citoplasmática (Mayes & Sirard, 2001).

En el presente estudio se determinó que un 6,3% de ovocitos no presentaron una expansión de sus células del cúmulus, lo cual llevaría a que no sean considerados para que continúen con el proceso de fecundación *in vitro*. Sin embargo, el porcentaje de maduración nuclear de nuestro experimento se encuentra dentro del rango descrito para medios que utilizan hormonas como suplemento (45-89%; Armstrong et al., (1991) En otros trabajos los porcentajes de maduración nuclear son menores (57,78%), al utilizar el TCM 199 como medio base (Delgado, 2017) y el 49,58% establecidos por Marcano et al. (2005).

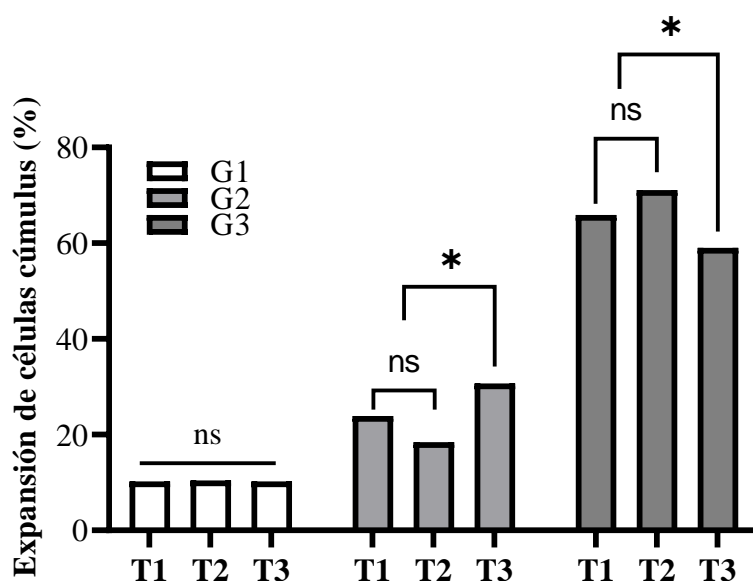
## **5.2 Resultados de la maduración *in vitro* analizada por tratamientos**

A continuación, se exponen los resultados del porcentaje de la expansión de las células del cúmulus (G1=grado 1; G2=grado 2 y G3=grado 3; Fig. 3) en los tres tratamientos evaluados (T1 = in house 1; T2 = in house 2; T3 = comercial).

Se determinó que los tres tratamientos presentaron porcentajes similares ( $p>0,05$ ) de COC´s con grado 1 de expansión de las células; es decir no llegaron a madurar (T1=10,2%; T2=10,2% y T3=10,4% respectivamente). En grado 2 (expansión parcial de las células del cúmulus) se observó que el grupo testigo (comercial=T3; 30,7%) presentó mayor porcentaje ( $p<0,05$ ) de COC´s comparado con los tratamientos 1 (23,9%) y 2 (18,4%) y estos dos últimos fueron similares entre sí ( $p>0,05$ ).

Finalmente, llegaron a presentar expansión total de las células (Grado 3; maduración morfológica) un 65,9% (T1), 71,1% en T2 con un error estándar de la media de 1,54, indicativo de porcentajes similares entre estos dos tratamientos ( $p>0,05$ ); sin embargo, T3 presentó un porcentaje menor (59%) a los dos tratamientos anteriores con diferencia estadística ( $p<0,05$ ). Estos resultados indican que los medios de maduración in house

1 y 2 proporcionaron mejores resultados en maduración *in vitro* valorada mediante el grado de expansión de las células del cúmulus.



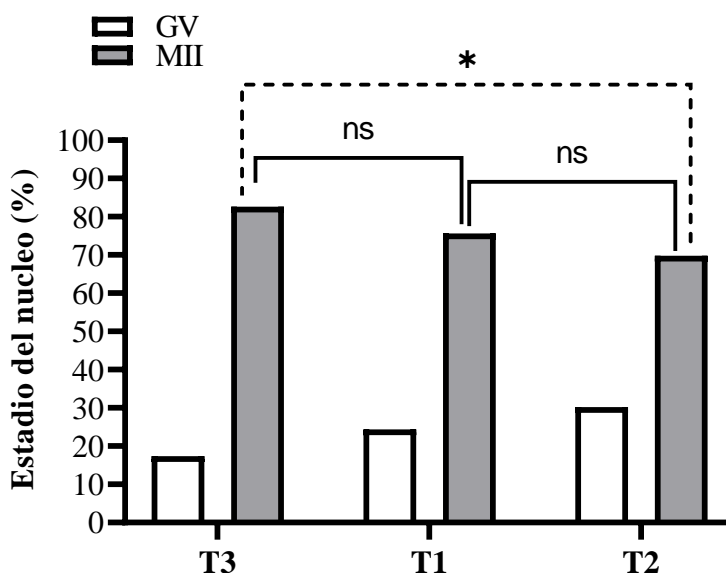
**Figura 3:** Porcentaje de expansión de las células del cúmulus de los COC's luego de 24 horas de maduración *in vitro* en los tratamientos T1=*in house* 1; T2=*in house* 2 y T3=Testigo. ns=No hay diferencia entre tratamientos. \*= diferencia estadística entre tratamientos. Prueba de Chi cuadrado 5%.

Se aduce que el mayor porcentaje de expansión de las células del cúmulus en los tratamientos 1, 2, comparado con el tratamiento 3 (medio comercial) es debido a que el medio comercial BO-IVM™; no cuenta con suero fetal bovino (SFB), y según trabajos en los cuales se valora la adición de SFB se llegó a determinar que el FSB provoca un efecto bifásico en el desarrollo embrionario, dado que reduce la expansión en las primeras horas de la MIV, pero que luego acelera la expansión celular, y esto se encuentra vinculado con un mayor número de células embrionarias, acompañado de una mejor tasa de producción y eclosión (Peláez, 2011). Sin embargo, hay trabajos que mencionan que la adición de SFB no contribuye significativamente en el proceso de maduración celular (Mucci et al., 2006), y que más bien la suplementación de SFB ha generado una reducción en el crecimiento celular (Ferguson & Leese, 1999).

Por lo tanto, los medios in house 1 y 2 al contener suplementación de SFB en este experimento ha demostrado ser más eficiente en el proceso de maduración *in vitro*, frente al testigo (medio comercial sin SFB).

### 5.3 Evaluación de la progresión de la meiosis en los tratamientos

En la evaluación de la progresión de la meiosis o configuración de la cromatina se tomó como referencia COC's en estadio de célula germinal (GV) y COC's en metafase II (MII), en los tratamientos (T1; T2 y T3) sujetos a evaluación se describen en la Fig. 4.



**Figura 4:** Porcentaje de COC's que llegaron a la metafase II (MII) en los tratamientos T1=*in house* 1; T2=*in house* 2 y T3=Testigo. ns=No hay diferencia entre tratamientos. \*= diferencia estadística entre tratamientos. Prueba de Chi cuadrado al 5%.

Se determinó porcentajes similares ( $p > 0,05$ ) de COC's en los tres tratamientos (T1=24,4%; T2=30,2% y T3=17,4%) que luego de 24h de maduración *in vitro* se quedaron en estadio de vesícula germinal (GV). Al comparar los ovocitos que llegaron a metafase II, se observó que el tratamiento 3 (testigo; 82,6%) y T1 (75,6%) obtuvieron porcentajes similares de maduración nuclear ( $p > 0,05$ ); sin embargo, T3 mostró valores superiores a T2 (69,8%;  $p < 0,05$ ), pero los dos medios elaborados *in house* no mostraron diferencia porcentual estadística ( $p > 0,05$ ) entre sí.



El porcentaje de COC's que no llegaron a MII concuerda con trabajos realizados con COC's obtenidos de ovarios de camal, donde se determinó que un 22,4% se quedaron en GV (Duma, 2019). Los porcentajes de maduración nuclear obtenidos en el presente trabajo son similares a los valores establecidos por Alm et al., (2005), quienes describen porcentajes de maduración entre el 77,5% y el 58,1%.

Para alcanzar una producción *in vitro* de embriones eficaz es necesario el uso de suplementos de macromoléculas y condiciones atmosféricas, entre los suplementos de macromoléculas más utilizadas están la albúmina sérica bovina y el suero fetal dado que contribuyen al transporte de fluidos mediante la membrana celular, la cual mejora la maduración y desarrollo embrionario al favorecer la expansión de las células del cúmulo (Santa Cruz et al., 2014). Esta se convierte en una explicación de mejores resultados en T1 (65,9%) y T2 (71,1%) al contener como reactivo SFB a diferencia del T3 medio comercial donde no se evidencia dicho elemento y presenta valores bajos.

Sin embargo, en el proceso de la meiosis se encuentra que T3 muestra mejores resultados (82,6%) en relación de los otros medios probablemente por la modificación de los suplementos de macromoléculas que podría contener el medio comercial, puesto que el reemplazo del suero fetal favorece a procesos de reinicio de meiosis. Una explicación tentativa de dicha variabilidad puede deberse a la recolección de ovocitos alteradas por la experiencia del operador, método utilizado y características propias de ovarios, asociado con la edad, raza y el estado reproductivo de la vaca (Santa Cruz et al., 2014). Además, de acuerdo a Arlotto et al. (1996) las diferencias en la maduración pueden modificarse en base al lugar en donde se ubican los folículos durante la realización del estudio.

De Loos et al. (1992), manifiesta que la maduración ovocitaria óptima no solo involucra al proceso de metafase II y extrusión del cuerpo polar, sino a los procesos de sincronización con la maduración citoplasmática, sumado a un adecuado sistema y medio de cultivo, siendo una posible explicación de las diferencias halladas entre los tres tratamientos.

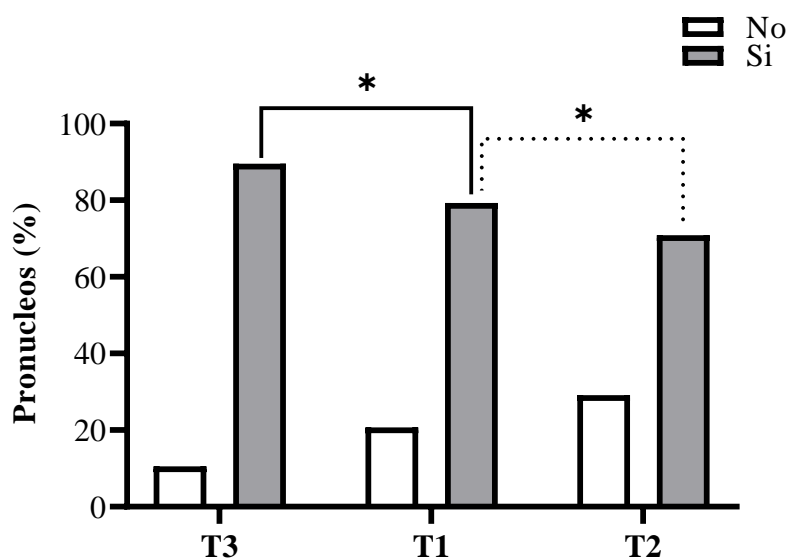
Por su parte, Salgado & Lopera (2020) mencionan que existen factores que pueden intervenir en los procesos de MIV, como el soporte físico, es decir, si fue colocado en placa o tubo; el modo en que se colocó el método de cultivo, sea por gota o pozo; si se

adicionó aceite mineral, el número de los COC´S por volumen de medio y la presencia de movimiento o no (Hatýrnaz et al., 2018).

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten determinar que el medio de elaboración casera in house 1 es tan efectivo en el proceso de maduración como el medio comercial (T3). Ambos tratamientos cuentan con ovocitos grado 2 y grado 3 dado que son los más deseables para la selección de ovocitos necesarios para el procedimiento de maduración in vitro, presencia de citoplasma uniforme sin rompimientos y vesículas (Dinkar y Shankar, 2013).

#### 5.4 Evaluación de la formación de pronúcleos en los tratamientos post-FIV

En este apartado se analiza los ovocitos que llegaron a formar pronúcleos en los tratamientos aplicados, partiendo de dos caseros y uno de la casa comercial. Dichos resultados se presentan a continuación en la Fig. 5.



**Figura 5:** Porcentaje de ovocitos que llegaron a formar pronúcleos en los tratamientos T1=in house 1; T2=in house 2 y T3=Testigo. \*= diferencia estadística entre tratamientos. Prueba de Chi cuadrado al 5%.

Luego de la fecundación *in vitro* se observó diferencias significativas entre el grupo testigo (T3), al presentar un porcentaje de 89,5% y el grupo in house 1 (T1) con un valor de 79,3%, encontrando mejores resultados en el grupo de la casa comercial “Testigo”.

De igual manera al contrastar in house 1 (79,3%) e in house 2 (70,9%) se observó diferencia entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En relación a la formación de pronúcleos, se encontró que los tratamientos aplicados contribuyendo a dicho crecimiento, en los tres grupos de análisis, en porcentajes elevados, otorgando evidencias de que los métodos favorecen al proceso de fertilización *in vitro*, esto basado en el principio que los tres medios contienen estradiol y esta descrito que esta hormona mejora los procesos de maduración (Bever et al., 1997) y luego contribuye a la formación de pronúcleos y a su desarrollo (Parrish, 2014).

Estos resultados obtenidos en la presente investigación corroboran los resultados descritos por Fernández et al., (2007) quienes en sus tres ensayos de fertilización encontraron un promedio de 73,3% valores similares a los nuestros. Por otra parte, Urrego et al., (2008) establecieron comparaciones entre medios de fertilización *in vitro* convencional y modificado, hallando una media de 73,1% y 70,8% valores iguales a los de nuestro trabajo. Existen trabajos que describen porcentajes del 81,81% de formación de pronúcleos Salgado et al. (2010) pero en condiciones diferentes y medios con otros componentes a los nuestros dado que emplearon mayor porción de LH (100  $\mu\text{g/ml}$ ) superior a la FSH en el medio de maduración, indicando mayor influencia positiva de la hormona en la tasa de penetración.

Crespo y Guamán (2015) obtuvo 81,48% de formación de pronúcleos dado que utilizó 500  $\mu\text{L}$  de medio de fecundación en los pozos de lavado y 250  $\mu\text{L}$  en los pozos de fecundación y se introdujeron las cajas en la incubadora a 2 gases, la cual permaneció allí alrededor de 2 horas previo a la fecundación, además emplearon heparina porcina + PHE.

Sin embargo, el medio comercial de fecundación *in vitro* como ya se indicó proporcionó mayores porcentajes de pronúcleos comparado con los medios de preparación casera in house 1 y 2, esta característica estaría ligada a dos particularidades: la primera está ligada al medio utilizado para la preparación espermática previo a la fecundación, en el caso de T3 (comercial) se usó el medio comercial que viene dentro del paquete comercial (BO-SemenPrep™) y para T1 y T2 la clasificación espermática fue ejecutada mediante columnas de Percoll, por lo que se considera que es un factor que podría haber influido en la FIV. Por otro lado, el medio comercial contiene heparina, gentamicina y solución PHE necesarias para mejorar la capacidad espermática y la

formación de pronúcleos al realizar un proceso de centrifugado más suave, requiere menos pasos que los tradicionales y caseros con la finalidad de evitar el daño celular (IVF Bioscience, 2017). No obstante, la totalidad de los componentes del medio de fecundación comercial no se encuentran descritos por el fabricante y esto limita el saber que podría estar ayudando a mejorar los resultados frente a los de fabricación casera.

A pesar de esta diferencia el porcentaje de pronúcleos obtenidos con los medios de fabricación casera están dentro de los establecidos a nivel internacional en los diferentes trabajos, por lo tanto, es una alternativa con gran potencial de uso en nuestro medio.

## 6 CONCLUSIONES

- El medio de maduración in house 1 es tan eficiente como el medio comercial, ya que permiten obtener porcentajes de maduración similares a los determinados a nivel internacional.
- El medio de maduración comercial permite obtener mayor porcentaje de pronúcleos luego de 24 horas de fecundación *in vitro* comparado con el medio in house 1 e in house 2 cuyos porcentajes se encuentran dentro de los parámetros establecidos por otros autores.
- El medio de maduración in house 1 proporciona más ovocitos con pronúcleos comparado con el medio in house 2.
- El medio de fecundación comercial (T3) presenta mayor porcentaje de pronúcleos en relación al tratamiento in house 1, el cual tiene mejor resultados que in house 2.
- Los tres tratamientos empleados para la fecundación favorecen al crecimiento y formación de pronúcleos en porcentajes elevados dado que contienen estradiol, hormona encargada de la mejora de los procesos de maduración.
- Los tratamientos caseros (in house 1 e in house 2) para la fertilización *in vitro* presentan porcentajes de pronúcleos acorde a lo estandarizado a nivel internacional, resultando ser una alternativa con elevado potencial en el medio.

## 7 RECOMENDACIONES

- Sería importante investigar el empleo de diferentes concentraciones de los componentes en los medios denominados in house (caseros), con el fin de buscar incrementar el porcentaje de maduración.
- Se sugiere emplear otras razas de vacas para establecer comparaciones en los tres tratamientos, con el fin de comprobar si incide la presencia de factores genéticos tanto en MIV y FIV en ovocitos bovinos.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Wahab, A., Aziz, R. L. A., Helmy, N. A., & Ibrahim, S. S. (2018). The impact of using newborn bovine serum as fetal calf serum substitute in the in vitro bovine embryos production system. *Porto Biomedical Journal*, 3(2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.PBJ.0000000000000003>
- Alm, H., Torner, H., Löhrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I. M., & Kanitz, W. (2005). Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, 63(8), 2194–2205. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.09.050>
- Armstrong, D. T., Zhang, X., Vanderhyden, B. C., & Khamsi, F. (1991). Hormonal Actions during Oocyte Maturation Influence Fertilization and Early Embryonic Development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 626(1), 137–158. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1991.TB37908.X>
- Arlotto, T., Schwartz, J. First, N. & Leibfried. M. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45(2), 943-956. doi: 10.1016/0093-691x(96)00024-6
- Avilés, K. G. (2011). Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides Epididimarios y Eyaculados en la especie porcina [Universidad de Murcia]. In *TDR (Tesis Doctorales en Red)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/108090>
- Ayala, L., Samaniego Campoverde, J., Argudo Garzón, D., Perea Brugal, M., Perea Ganchou, F., Rodas Carpio, E., & Nieto Escandón, P. (2020). El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(1), e17571–e17571. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17571>
- Bahrami, M., Morris, M. B., & Day, M. L. (2019). Amino acid supplementation of a simple inorganic salt solution supports efficient in vitro maturation (IVM) of bovine oocytes. *Scientific Reports*, 9(1), 11739. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48038-y>
- Bevers, M. M., Dieleman, S. J., van den Hurk, R., & Izadyar, F. (1997). Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47(1), 13–22. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00335-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00335-4)
- Bóez Contreras, F. J., Hernández, L., & Villamediana Monreal, P. C. (2008). Estudio Estructural del Huso Meiótico de Ovocitos Bovinos Vitriificados. *Revista Científica*, 18(3), 253–261. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592008000300003&lng=es&tlng=e](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592008000300003&lng=es&tlng=e)
-

- Bucher, K., Malama, E., Siuda, M., Janett, F., & Bollwein, H. (2019). Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: A tool for the evaluation of bull fertility. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11652–11669. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-16572>
- Carazas, K. E., & Ayala, C. (2019). Evaluación de dos medios para la maduración de ovocitos in vitro en ganado bovino (*Bos taurus*) en condiciones de altura. *Apthapi*, 5(1), 1441–1449.
- Carrillo, D. F., Hernández Herrera, D. Y., & Vásquez Araque, N. A. (2021). Evaluación del YM976 como alternativo a las hormonas gonadotrópicas en la maduración in vitro de oocitos bovinos y su competencia para el desarrollo embrionario. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 32(6), e20341–e20341. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i6.20341>
- Colazo, M. G., & Mapletoft, R. J. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*, 9(1), 20–37. <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n09a03colazo.pdf>
- Condori, R., Quispe, C., Ancco, E., Dipaz, D., & Mellisho, E. (2019). Sobrevivencia de blastocistos bovinos producidos in vitro vitrificados en dispositivos VITRI-TIP Y VITRI-TOP. *SPERMOVA*, 9(1), 48–52. <https://doi.org/10.18548/aspe/0007.07>
- Crespo, J. & Guamán, E. (2015). *Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Difussion*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/7f33e203-b4f0-461f-85d8-5fbf9872e24f/content>
- De Loos, F., van Beneden, T., Kruij, T. A. M., & van Maurik, P. (1992). Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 31(3), 208–214. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080310308>
- Delgado Fernández, R. C. (2017). *Maduración in vitro de ovocitos en metafase II de vacas post mortem a través de la técnica de fijación* [Universidad Agraria La Molina]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2942?show=full>
- Dinkar K. S., Shankar B. H. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: A review. *Adv Biosci Biotechnol*. 4:170-182
- Duma, M. J. (2019). *Evaluación de la eficacia de la prueba del Azul Brillante de Cresilo (BCB) en la determinación de la competencia de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero* [Universidad de Cuenca]. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32159/1/TRABAJO-DE-TITULACIÓN.pdf>
-



- Espin, P. S. (2018). *Maduración de ovocitos con dos medios de maduración diferentes* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16502/1/UPS-CT007995.pdf>
- Ferguson, E. M., & Leese, H. J. (1999). Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 116(2), 373–378. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1160373>
- Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, 48(1), 51–60. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-65762007000100006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762007000100006&lng=es&tlng=es)
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- García Herradón, P., Quintela Arias, L., Becerra, J. J., Ruibal, S., & Fernández, M. (2007). Fecundación in vitro: Alternativa para la mejor genética en bovinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 1022-1301*, 15(January), 34. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/27-in\\_vitro.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/27-in_vitro.pdf)
- Gardner, D. K. (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reproduction, Fertility, and Development*, 20(1), 9–18. <https://doi.org/10.1071/RD07160>
- Giovambattista, G., & Peral García, P. (2010). *Genética en Animales Domésticos* (1st ed., Vol. 1). Inter-Médica.
- González, V. (2012). *Evaluación de la expansión de las células del cúmulo en la maduración in vitro de tres tipos morfológicos de oocitos procedentes de ovarios de vacas de matadero* [Universidad Nacional de Loja]. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5394/1/Tesis%20%e2%80%9cEVALUACI%c3%93N%20DE%20LA%20EXPANSI%c3%93N%20DE%20LAS%20C%c3%89LULAS.pdf>
- Gonella, Á. M., Atuesta Bustos, J. E., Bernal Ulloa, S. M., & Chacón Jaramillo, L. M. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(1), 65–79. <https://doi.org/10.22490/21456453.1967>
- Hatýrnaz, P., Ata, B., Hatýrnaz, E., Dahan, M., Tannus, S., Tan, J., & Tan, S. (2018). Oocyte in vitro maturation: a sytematic review. *Turk J Obstet Gynecol*, 15, 112–125

- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., & Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, *52*(4), 683–700. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4)
- IVF Bioscience. (2017). *The IVF Bioscience Media Brochure*. <http://ivfbioscience.com/wp-content/uploads/IVF-Bioscience-Brochure-2017.pdf>
- Landínez, J. A., Hernández Fonseca, H. J., Villamediana, P. C., & Soto Belloso, E. (2010). Efecto del tiempo de maduración in vitro de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Nota técnica. *Revista Científica*, *XX*(6), 659–664. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95916206013>
- Lane, M., & Gardner, D. K. (2000). Lactate Regulates Pyruvate Uptake and Metabolism in the Preimplantation Mouse Embryo. *Biology of Reproduction*, *62*(1), 16–22. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD62.1.16>
- Liu, B., Cui, Y., & Yu, S. jiu. (2013). Effect of Swim-Up and Percoll Treatment on Sperm Quality and In vitro Embryo Development in Yak. *Journal of Integrative Agriculture*, *12*(12), 2235–2242. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60378-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60378-0)
- López, S. E. (2020). *Efecto de la gonadotropina coriónica equina (ECG) en la tasa de preñez en vacas Brahman con protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en condiciones de altitud* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19468/1/UPS-CT008879.pdf>
- Luo, Y., Zhang, R., Gao, J., Wang, Y., Zhang, W., & Qing, S. (2020). The localization and expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in bovine ovary during oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals*, *55*(7), 822–832. <https://doi.org/10.1111/RDA.13690>
- Machado, M. F., Caixeta, E. S., Sudiman, J., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G., Lima, P. F., Price, C. A., Buratini, J., Fernandes Machado, M., Siqueira Caixeta, E., Sudiman, J., B. Gilchrist, R., G. Thompson, J., Lima, P. F., A. Price, C., & Buratini, J. (2015). Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro–produced embryos in cattle. *Theriogenology*, *84*(3), 390–398. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.03.031>
- Marcano, L., Villamediana Monreal, P. C., & Rodríguez Tellez, B. E. (2005). Efecto de la exposición al cloruro de cadmio sobre la maduración in vitro de ovocitos bovinos. *Revista Científica*, *XV* (5), 443–450. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95915508>
- Martínez, Y. (2013). *Análisis de la morfología ovocitaria en bovino previa a FIV* [Universidad de Oviedo]. <http://hdl.handle.net/10651/17398>

- Mayes, M. A., & Sirard, M. A. (2001). The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, 55(4), 911–922. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00453-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00453-8)
- Melchor, A., Zúñiga Rosales, Y., Zulueta Rodríguez, O., Hernández Pérez, L., & López Cisnero, R. (2019). Purificación y caracterización de gonadotropina coriónica humana para uso diagnóstico. *Revista Cubana de Química*, 31(2), 0. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443559859006>
- Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 97–104. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2006000200002>
- Nedambale, T. L., Du, F., Xu, J., Chaubal, S. A., Dinnyes, A., Groen, W., Faber, D., Dobrinsky, J. R., Yang, X., & Tian, X. C. (2006). Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66(8), 1951–1960. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.044>
- Palasz, A., & de la Fuente, J. (2008). Cultivo de embriones bovinos: Efecto de los medios de cultivo y de los requerimientos fisiológicos sobre la calidad de los embriones producidos in vitro. Parte (II). *CIS-B*, 9(5), 12–17. [http://axonveterinaria.net/web\\_axoncomunicacion/criaysalud/9/cys\\_9\\_Cultivo\\_embriones\\_bovinos.pdf](http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/9/cys_9_Cultivo_embriones_bovinos.pdf)
- Palma, G. (2018). Producción in vitro de embriones bovinos. In *Bioteología de la Reproducción* (p. 225).
- Palomino Martorell, H. (2000). *Bioteología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los Andes* (1st ed., Vol. 1). A.F.A.
- Parrish, J. J. (2014). *Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- Peippo, J., Machaty, Z., & Peter, A. (2011). Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. *Theriogenology*, 76(8), 1373–1379. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.06.018>
- Peláez, V. A. (2011). *PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS* [Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Puri, G., Chaudhary, S. S., Singh, V. K., & Sharma, A. K. (2015). Effects of fetal bovine serum and estrus buffalo serum on maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes in vitro. *Veterinary World*, 8(2), 143–146. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.143-146>

- Rivera, L. A. (2018). *Vaca repetidora descripción y problemática en los hatos ganaderos* [Universidad Cooperativa de Colombia]. <https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/12514>
- Robledo, J., Herrera, J., Cajero, M., Navarro, M., & García, A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 95–99. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243009>
- Romero Tintín, J. C. (2019). Producción de embriones in vitro con ovocitos obtenidos con tres protocolos de estimulación ovárica y aspirados por Ovum Pick Up en vacas Holstein mestizas [Universidad de Cuenca]. In *Sustainability (Switzerland)*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32174/1/TRABAJO-DE-TITULACION.pdf>
- Salgado, E., & Lopera, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(3), 17138. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I3.17138>
- Salgado-Otero, R., Vergara-Garay, O., & Simanca-Sotelo, J. (2013). Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados In vitro. *Revista Científica*, XXIII (4), 325–328. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95926991004>
- Salgado, R., Vergara, O., & Ramírez, L. (2010). Efecto de gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de oocitos bovinos cultivados in vitro Efecto de gonadotropinas. *Revista MVZ Córdoba*, 15(1), 1954–1960. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0122-02682010000100008&lng=es&nrm=is](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-02682010000100008&lng=es&nrm=is)
- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., Tomaskovic, A., Petric, J., Surina, J., Grizelj, J., & Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, 91(3–4), 237–247. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.04.005>
- Sánchez, J. J. (2018). *Transferencia de embriones bovinos in vitro* [Universidad Cooperativa de Colombia]. [https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/6109/1/2018\\_transferencia\\_embryones\\_bovinos.pdf](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/6109/1/2018_transferencia_embryones_bovinos.pdf)
- Santa Cruz, C., Huanca, W., Condori, R., & Ampuero, A. (2014). Uso de macromoléculas sobre la tasa de maduración y desarrollo embrionario in vitro de ovocitos bovinos. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 25(4), 487–493. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v25n4/a06v25n4.pdf>

- Selvaraju, S., Parthipan, S., Somashekar, L., Binsila, B. K., Kolte, A. P., Arangasamy, A., Ravindra, J. P., & Krawetz, S. A. (2018). Current status of sperm functional genomics and its diagnostic potential of fertility in bovine (*Bos taurus*). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64(6), 484–501. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1444816>
- Simancas, V., Vergara, C., & Díaz, A. (2018). Influencia del suero fetal bovino en el cultivo de fibroblastos gingivales. *Avances En Odontostomatología*, 34(6), 1–11. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-12852018000600004](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852018000600004)
- Sithole, S. M., Mphaphathi, M. L., Sebopela, M. D., & Nedambale, T. L. (2021). 137 Comparison of two invitro maturation media on polar body extrusion of cattle oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 33(2), 176. <https://doi.org/10.1071/rdv33n2ab137>
- Stroebech, L., Mazzoni, G., Pedersen, H. S., Freude, K. K., Kadarmideen, H. N., Callesen, H., & Hyttel, P. (2015). In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Anim. Reprod.*, v, 12(3), 465–472. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag465-472%20%28AR749%29.pdf>
- Tarazona, A., Álvarez, J., Bedoya, J., & Ruiz, Z. (2014). Tinciones utilizadas en oocitos y embriones bovinos... In *Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos: Libro y procedimientos* (1st ed., Vol. 1, pp. 151–163). Fondo Editorial Biogénesis. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/326469>
- Thompson, J. G., Allen, N. W., McGowan, L. T., Bell, A. C. S., Lambert, M. G., & Tervit, H. R. (1998). Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology*, 49(6), 1239–1249. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00071-5)
- Urrego, R., Tarazona, A., Camargo, O., & Olivera Ángel, M. (2008). Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción in vitro de embriones bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(3), 398–405. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295023540009>
- Van-Der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J. J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEx*, 35(1), 99–118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>

Ynsaurrale, A. E., Aguilar, D., Dellavalle, F., & Benítez, J. M. (2019). *Reseña De La Evolución De Las Biotecnologías Reproductivas En Bovinos*. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_biotecnologia\\_110.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_biotecnologia_110.pdf)

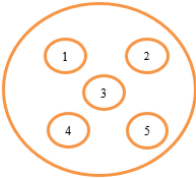
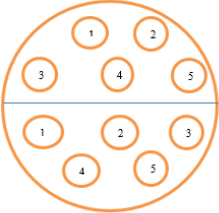
Zárate, G. O. E. (2006). Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos [Universidad Veracruzana]. In *Tesis de Maestría Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver. Mexico*. <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/9755>

## 9 ANEXOS

### **Anexo 1: Objetivo 1 “Evaluación de la expansión de las células de cúmulus”**

**Día 1:** Recolección y procesamiento de ovocitos provenientes de ovarios de matadero y maduración *in vitro* (MIV).

Plantilla 1: ingreso de ovarios, gotas de maduración y evaluación de expansión de células del cúmulus.

Operadores:	Luis Espinoza Sigüencia Genaro Calle Zarate						Maniobra:	
<b>RECOLECCION Y MADURACION OVOCITARIA</b>								
Número de Maniobra	Fecha de la Maniobra	Procedencia	Nº De Ovarios	Hora de Llegada	Nº de COC's Aptos	Medio de Recuperacion	Hora de la MIV	
1	29/11/2021	EMURPLAG	30	11:10	98	H-SOF	13:55	
2	1/12/2021	EMURPLAG	24	11:30	95	H-SOF	13:35	
3	6/12/2021	EMURPLAG	18	11:20	71	H-SOF	13:40	
4	8/12/2021	EMURPLAG	24	11:30	108	H-SOF	14:04	
5	13/12/2021	EMURPLAG	17	11:25	59	H-SOF	14:12	
6	15/12/2021	EMURPLAG	17	12:25	80	H-SOF	14:35	
7	3/1/2022	EMURPLAG	17	11:30	100	H-SOF	13:45	
<b>Total</b>			147		611			
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> <p>SISTEMA EN GOTAS "BO-IVM"=T:</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>SISTEMA EN GOTAS "in house 1" e "in house 2"</p>  </div> </div>								
Ovocitos por gota: _____					Ovocitos por pocillo: _____			
Numero de gotas empleadas: _____					Numero de pocillos empleados: _____			
Suplementos empleados: _____								
Ovocitos totales en maduración: _____								
Hora final de maduración: _____								
<b>EVALUACION MIV EXPANSION DE CC.</b>								
	Gota 1	Gota 2	Gota 3	Gota 4	Gota 5	Total	% de Expansión	
Expansión G1								
Expansión G2								
Expansión G3								
<b>Total</b>								





Llegada de ovarios desde el camal a 37°C



Corte de estructuras adyacentes y lavado de ovarios



Punción de ovarios con folículos de 2-10mm. Con jeringa de 10ml y aguja 18g x 1 1/2





Búsqueda y clasificación de  
COC's



COC's aptos para maduración *in vitro*



Gotas de lavado de ovocitos  
previo a la maduración *in vitro*

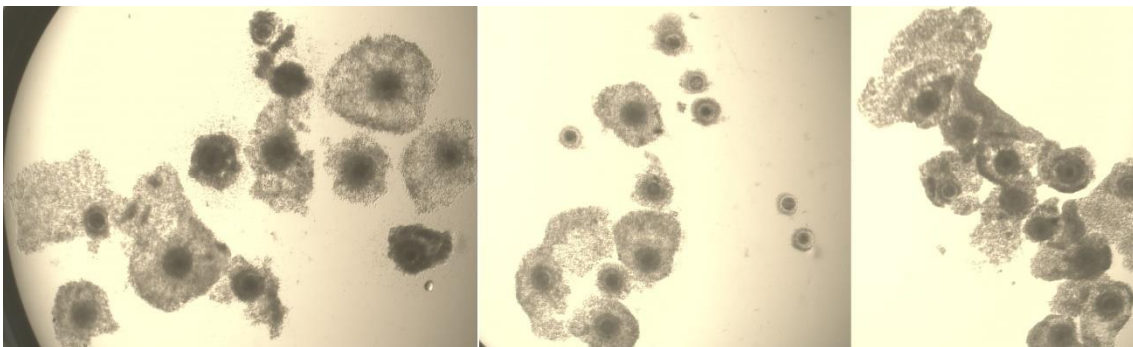


Gotas con medio de maduración  
de ovocitos



Se coloca en la incubadora por 24 desde el inicio de la aspiración

**Día 2:** Evaluación de la expansión de las células del cummulus



Evaluación de la expansión de las células del cúmulus. Control, Tratamiento 1 y Tratamiento 2, respectivamente.

**Anexo 2: Objetivo 2 “Evaluación de la maduración nuclear posterior a la MIV”**

Lavado, fijado, teñido y montado de ovocitos que han madurado



Retiro de la caja de maduración  
luego de 24 horas



Los COC's maduros de los  
grupos se colocan en tubos  
cónicos de 15ml

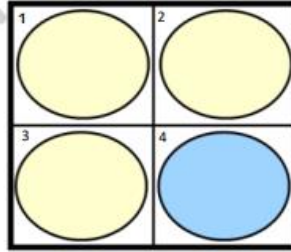


Los tubos ingresan por 60  
segundo en el Vortex





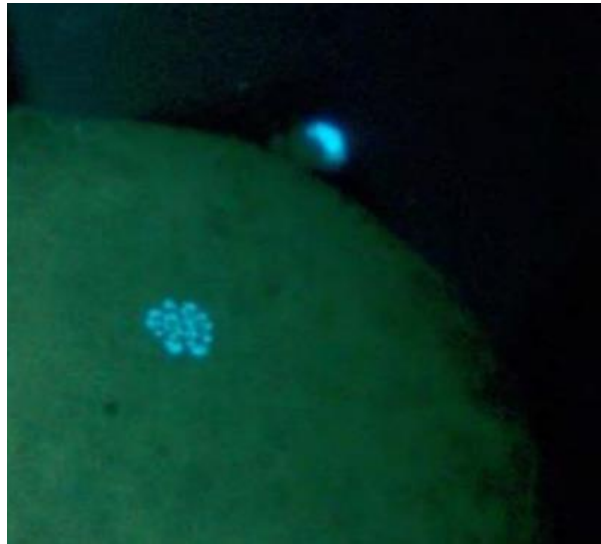
Well #1: 500µl PBS  
Well #2: 500µl PBS + 10µl Glutaldehyde 25%  
Well #3: 500µl PBS  
Well #4: 500µl Stain Hoechst solution



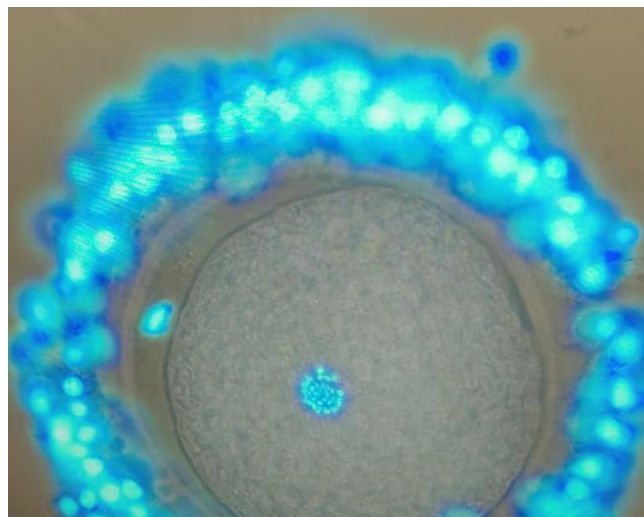
Procedimiento de fijado, teñido y montaje de ovocitos. Se trabaja sin luz.



Ingreso de 10 ovocitos por gota y se coloca cubre objetos



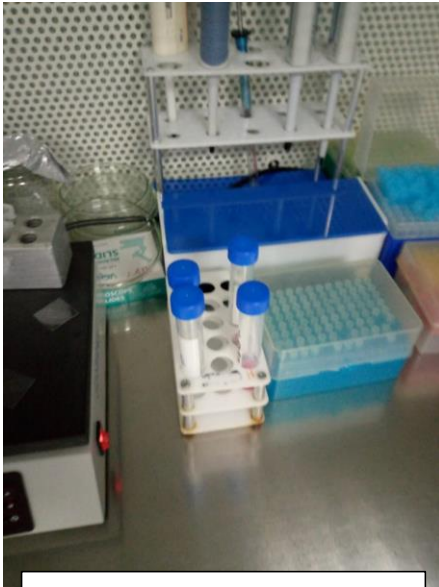
Se observa en el microscopio de fluorescencia la maduración nuclear



**Anexo 3: Objetivo 3 "Evaluación de la progresión de la meiosis posterior a la FIV".**

**Día 3:** Se realizan los procedimientos efectuados en objetivos: **1 y 2.**

Elaboración de medios de fertilización, suplementación y estabilización.



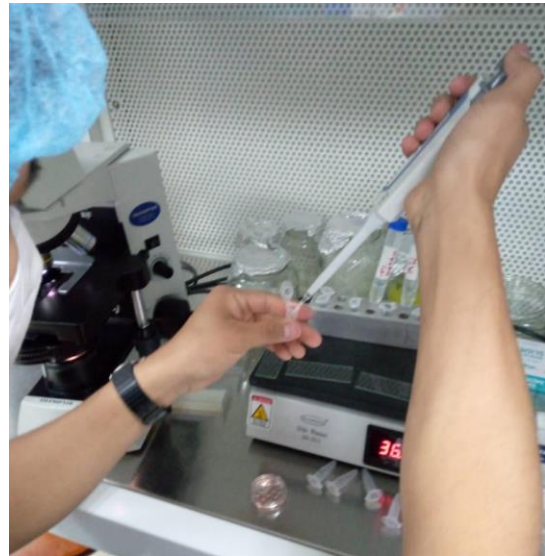
Sacar los medios para suplementación



Adición de aceite mineral a la placa de fertilización



Se estabilizan los medios por 2 horas como mínimo.



Se colocan los espermatozoides en la centrifuga para su capacitación. Y se procede al conteo en la cámara de Neubauer para el cálculo de la dosis inseminante.



Se preparan los tubos eppendorf para los distintos tratamientos y se realizan las columnas de los gradientes de selección usando Bovipure®, posterior a la descongelación de la pajuela.

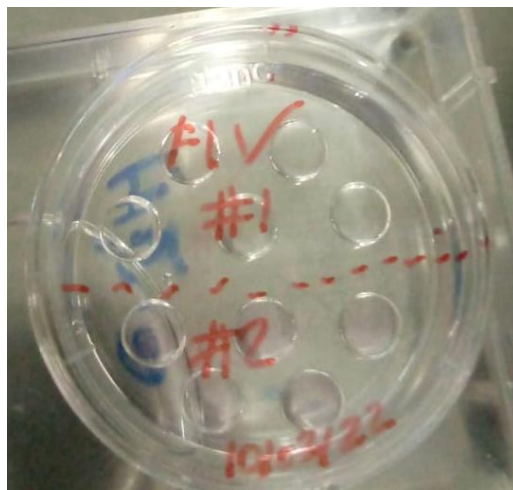




Preparación de la cámara de Neubauer



Retirar ovocitos de la incubadora y realizar el posterior lavado

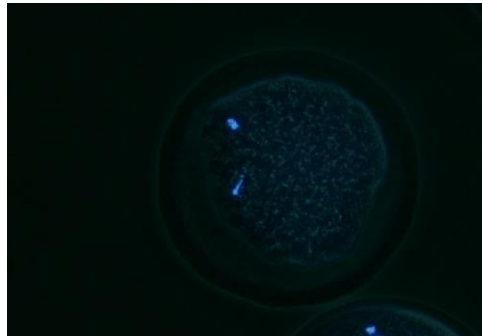


Colocar las dosis inseminantes en cada tratamiento.



Pasadas las 24 horas en la incubadora se realiza el procedimiento de lavado, fijado, tinción y montaje para la visualización en el microscopio de fluorescencia

#### **Día 4: Evaluación**



Evaluación de la penetración espermática en los ovocitos, 24 horas posterior a la FIV