

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA**



**INFLUENCIA DE UN SISTEMA DE COCULTIVO CON CÉLULAS DEL  
*CÚMULUS OOPHORUS* EN LA CALIDAD DE EMBRIONES  
PRODUCIDOS *IN VITRO***

Tesis para optar el título de:  
**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**Bach. SUSANA GUEVARA CHACÓN**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

2017

## **DEDICATORIA**

A mis padres Agliberto Guevara y Vilma Chacón que son mi motor, y los que me impulsan a seguir adelante, por su cariño incondicional, su amor y entrega a todos sus hijos, por apoyarme en los momentos difíciles y por haberme regalado la vida.

A mis hermanos mayores; Karin Licett, Yefri Ronal, Alex Manuel y Bettzabe, por alentarme a seguir superándome, y por apoyarme en los momentos difíciles.

A mis mejores amigos, por creer en mí, por su confianza y ánimo para seguir creciendo profesionalmente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer a Dios en primera instancia, por su amor, perdón y compañía, en los momentos de alegrías y tristezas.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza por brindar aulas, laboratorios y bibliotecas implementadas, que sirvieron para mi formación profesional y para realizar con éxito esta tesis.

Al rector de esta casa superior de estudios; el PhD. Jorge Luis Maicelo Quintana, por las facilidades brindadas durante mi educación.

A la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, por la excelente formación académica y profesional.

Al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología por el apoyo con el equipamiento para la realización de esta tesis.

A los profesores: PhD. Ilse Silvia Cayo Colca y Ms.C. Elías Alberto Torres Armas, por darme la oportunidad, libertad y estímulo para desarrollar mi trabajo, por su colaboración como Asesor y Co-asesor y en particular, porque gracias a su apoyo fue posible la culminación de esta meta. Por demostrar siempre su entusiasmo y paciencia, por su apoyo y consejos, que han influenciado en gran manera en mi formación tanto académica como personal. Pero sobre todo, por estar siempre dispuestos a instruir.

A todos los docentes que estuvieron presente durante los años de formación profesional, por sus valiosos conocimientos compartidos a través del transcurso de la carrera, y que contribuyeron tanto a despejar dudas como a planear nuevas ideas de investigación.

Y a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta estuvieron involucradas en la elaboración de este proyecto, e hicieron posible el logro de este trabajo de investigación.

Al Dr. Manuel Milla Pino por el asesoramiento en el diseño e interpretación del análisis estadístico.

## **AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

PhD. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA  
**RECTOR**

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES  
**VICERRECTOR ACADÉMICO**

Dra. MARÍA NELY LUJÁN ESPINOZA  
**VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

MS.C. Héctor Vladimir Vázquez Pérez  
**DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,  
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA**

## **VISTO BUENO DEL ASESOR**

Yo, PhD. Ilse Silvia Cayo Colca, identificado con DNI N° 09820879, docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, asesor de la tesis: “Influencia de un sistema de cocultivo con células del *cúmulus oophorus* en la calidad de embriones producidos *in vitro*”, presentado por:

Bach. SUSANA GUEVARA CHACÓN

Habiendo revisado el informe final de la tesis en mención, doy la conformidad y el visto bueno para continuar con sus trámites correspondientes.

---

PhD. ILSE SILVIA CAYO COLCA  
**ASESOR**

## **VISTO BUENO DEL JURADO**

---

Mv. NILTON LUIS MURGA VALDERRAMA  
PRESIDENTE

---

Ing. SEGUNDO JOSÉ ZAMORA HUAMÁN  
SECRETARIO

---

Ing. CESAR AUGUSTO MARAVÍ CARMEN  
VOCAL



# UNIVERSIDAD NACIONAL

## TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

### ANEXO 2-N

#### ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En la ciudad de Chachapoyas, el día 14 de Noviembre del año 2012, siendo las 17:00 horas, el aspirante: Bach. Susana Guevara Cebalón defiende públicamente la tesis titulada: "Influencia de un sistema de Cocultivo con células del címulus oophorus en la calidad de embriones producidos in vitro" para optar el Título Profesional de Ing. Zootecnista, otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado, constituido por: Presidente: M.V. Nilton Luis Murga Jalderrama. Secretario: M.Sc. Segundo José Zamora Huamán Vocal: Ing. Cesar A. Marín Carmen

Procedió el (los) aspirante (s) a hacer la exposición de los antecedentes, contenido de la tesis y conclusiones obtenidas de la misma, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la tesis presentada, los miembros del jurado pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones u objeciones consideraran oportunas, las cuales fueron contestadas por el los aspirante (s).

Tras la intervención de los miembros del jurado y las oportunas contestaciones del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los miembros del jurado presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el jurado determinará la calificación global concedida a la tesis, en términos de:

Notable o sobresaliente (    )      Aprobado (  )      No apto (    )

Otorgada la calificación el presidente del Jurado comunica, en sesión pública, la calificación concedida. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 18:00 horas del mismo día, el jurado concluye el acto de sustentación de la tesis.

  
SECRETARIO

  
PRESIDENTE

  
VOCAL

OBSERVACIONES: .....



## ÍNDICE GENERAL

	Pag.
DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
AUTORIDADES UNIVERSITARIAS .....	iii
VISTO BUENO DEL ASESOR .....	iv
VISTO BUENO DEL JURADO .....	v
COPIA DE ACTA DE SUSTENTACIÓN .....	vi
ÍNDICE GENERAL .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE IMÁGENES .....	x
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivo general .....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
III. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL .....	4
3.1. Antecedentes de la investigación .....	4
3.2. Bases teóricas .....	6
3.2.1. Características de los ovocitos de bovino .....	6
3.2.2. Maduración del ovocito .....	9
A) Maduración citoplasmática .....	9
B) Maduración nuclear .....	10
3.2.3. Maduración <i>in vitro</i> .....	10
3.2.4. Características del espermatozide bovino .....	12
3.2.5. Capacitación espermática .....	16
A) Hiperactivación .....	17
B) Hiperactivación <i>in vitro</i> .....	17
C) Reacción acrosómica .....	18

3.2.6. Fecundación <i>in vitro</i> .....	20
3.2.7. Cocultivo y desarrollo embrionario .....	21
A) Células del <i>cúmulus oophorus</i> .....	23
B) Características de las células del <i>cúmulus oophorus</i> .....	23
3.2.8. Cultivo <i>in vitro</i> .....	24
3.2.9. Viabilidad del embrión .....	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
4.1. Ubicación .....	28
4.2. Material biológico .....	28
4.2.1. Aspiración y selección de los COCs .....	28
4.2.2. Aislamiento y cultivo de células del <i>cúmulus oophorus</i> .....	28
4.2.3. Maduración <i>in vitro</i> de los COCs .....	30
4.2.4. Fecundación <i>in vitro</i> de los COCs .....	30
4.2.5. Cultivo <i>in vitro</i> .....	33
4.2.6. Determinación de la viabilidad de embriones .....	33
4.3. Análisis de datos .....	37
V. RESULTADOS .....	38
VI. DISCUSIONES .....	43
VII. CONCLUSIONES .....	45
VIII. RECOMENDACIONES .....	46
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	47
X. ANEXOS .....	57
10.1. Protocolo de producción de embriones <i>in vitro</i> .....	57
10.2. Proceso para la producción de embriones <i>in vitro</i> .....	61
10.3. Análisis estadísticos .....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura N° 01	Zona pelúcida y uniones gap
Figura N° 02	Organización de la cabeza del espermatozoide
Figura N° 03	Características generales del espermatozoide
Figura N° 04	Esquema de la reacción acrosómica
Figura N° 05	Estado de desarrollo y valoración morfológica
Figura N° 06	Blastocisto expandido
Figura N° 07	Categorización de los ovocitos
Figura N° 08	Vesícula germinal y metafase II
Figura N° 09	Expansión de las células del <i>cúmulus oophorus</i>
Figura N° 10	Divisiones embrionarias
Figura N° 11	Mórulas y blastocistos
Figura N° 12	Análisis de la viabilidad y actividad enzimática
Figura N° 13	Comparación entre estadio nuclear y sus porcentajes obtenidos
Figura N° 14	Relación entre el porcentaje de maduración y degenerados
Figura N° 15	Calidad de embriones según su viabilidad (actividad enzimática)
Figura N° 16	Porcentaje total de embriones viables
Figura N° 17	Porcentaje de segmentación embrionaria durante CIV

## LISTA DE TABLAS

Tabla N° 01	Estadio nuclear de ovocitos bovinos de folículos antrales
Tabla N° 02	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos
Tabla N° 03	Calidad de embriones en función a su viabilidad
Tabla N° 04	Porcentaje total de embriones viables

Tabla N° 05	Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones bovinos
Tabla N° 06	Preparación de solución salina al 0.9%
Tabla N° 07	Preparación del medio de lavado y búsqueda de ovocitos
Tabla N° 08	Preparación del medio de maduración
Tabla N° 09	Preparación del medio SOF base modificado
Tabla N° 10	Preparación del medio de fecundación y capacitación
Tabla N° 11	Preparación de Percoll
Tabla N° 12	Preparación del medio PBS 10X-1X
Tabla N° 13	Preparación del medio de cultivo

## **LISTA DE IMÁGENES**

Imagen N° 01	Preparación de medios
Imagen N° 02	Almacenamiento de medios
Imagen N° 03	Colecta de ovarios
Imagen N° 04	Aspiración de ovocitos
Imagen N° 05	Ovocito categoría A
Imagen N° 06	Tinción de ovocito con acetorceína
Imagen N° 07	Selección de COCs
Imagen N° 08	Incubación de ovocitos
Imagen N° 09	Ovocito en metafase II
Imagen N° 10	Blastocisto inicial
Imagen N° 11	Blastocisto expandido
Imagen N° 12	A-C embriones cultivados con cocultivo
Imagen N° 13	D-F embriones cultivados sin cocultivo

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	; Acrosoma
ADN	; Ácido desoxirribonucleico
CC	; Células del <i>cúmulus oophorus</i>
CE	; Capacitación espermática
CEOB	; Células del epitelio oviductal bovino
CG	; Células de la granulosa
CGP	; Células germinales primordiales
CIV	; Cultivo <i>in vitro</i>
CCIV	; Cocultivo <i>in vitro</i>
COCs	; Complejo <i>cúmulus</i> -ovocito
CP	; Corpusculo polar
EP	; Endodermo primitivo
EPI	; Epiblasto
FDA	; Fluorocromo diacetato de fluoresceína
FIV	; Fecundación <i>in vitro</i>
FSH	; Hormona folículo estimulante
HMG	; Hormona gonadotrofina menopáusica humana
IP	; Ioduro de propídio
LH	; Hormona luteinizante
MAE	; Membrana acrosómica externa
MAI	; Membrana acrosómica interna
MCI	; Macizo celular interno

MI	; Metafase I
MII	; Metafase II
MIV	; Maduración <i>in vitro</i>
MP	; Membrana plasmática
N	; Núcleo
OPU	; Ovum pick up
PBS	; Fosfato buffer salino
PIVE	; Producción de embriones <i>in vitro</i>
PNF	; Pronúcleo femenino
PNM	; Pronúcleo masculino
PVA	; Alcohol polivinílico
RA	; Reacción acrosómica
SE	; Segmento ecuatorial
SFB	; Suero fetal bovino
TCM	; Medio de cultivo tisular
TE	; Trofoectodermo
VG	; Vesícula germinal
ZP	: Zona pelúcida

## RESUMEN

Se sabe que las células del *cúmulus oophorus* favorecen el desarrollo de embriones producidos *in vitro*. El presente trabajo, tuvo como objetivo determinar la influencia de un sistema de cocultivo con células del *cúmulus oophorus* en la calidad (en función a su viabilidad) de embriones de bovino producidos *in vitro*. Para lo cual, se seleccionaron ovocitos aspirados de folículos de 2 – 6 mm de diámetro. Los ovocitos se maduraron en medio TCM-199, por 24 horas (h) en una atmósfera humidificada, 6% CO<sub>2</sub> y 38.5 °C. Luego de la MIV, los ovocitos se fecundaron *in vitro* por 18 h. Los presuntos cigotos fueron distribuidos al azar al grupo control (sin cocultivo) y al tratamiento (con cocultivo) por siete días. La evaluación del efecto del sistema con cocultivo sobre la calidad de embriones se determinó en función a su viabilidad haciendo uso de la prueba T-student al 5%. En calidad en función a su viabilidad, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambos sistemas de cultivo, a favor del sistema con cocultivo. Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la producción *in vitro* de embriones. En conclusión, el uso de cocultivos mejora la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, que podría reflejarse en la calidad de los mismos más no incrementa la tasa de producción *in vitro* de embriones.

Palabras clave: cocultivo, *cúmulus oophorus*, viabilidad de los embriones, producción *in vitro*.

## ABSTRACT

It is known that the cumulus oophorus cells improve the development of embryos produced *in vitro*. Therefore, the objective of this work was to determine the influence of a coculture system with cumulus oophorus cells on the quality (in function to its viability) and rate of bovine embryos produced *in vitro*. For this, oocytes from follicles of 2-6 mm diameter were aspirated. The oocytes were matured in TCM-199 medium, for 24 h in a humidified atmosphere, 6% CO<sub>2</sub> and 38.5 ° C. After IVM, the oocytes were incubated *in vitro* with viable sperms for 18 h. The zygotes were randomly distributed in two groups, the control (without coculture) and the treatment (with coculture) group, and cultured for seven days. The effect of the system with coculture on the quality (viability) of embryos was determined with the T-student test ( $p < 0.05$ ). For quality, significant differences were found ( $p < 0.05$ ) between both systems, being higher in the coculture system. In addition to this, the rate of embryo production, was not significantly different ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the use of our coculture system improves the viability of the embryos produced in this experiment, but does not increase the rate of them.

**Key words:** coculture, *Cumulus oophorus*, viability of the embryos, production *in vitro*.

## I. INTRODUCCIÓN

Se ha buscado durante años reproducir artificialmente los eventos de maduración y fecundación de los ovocitos. Sin embargo; lo que en sus inicios solo fue con fines de investigación, en la actualidad contribuye tanto al mejoramiento de la producción ganadera, como a la conservación de la fauna silvestre en peligro de extinción. Es por ello que se toman como modelo de investigación a animales domésticos (Swanson, 2006).

En las últimas décadas, la biotecnología de la reproducción ha experimentado avances acelerados y ha dotado a la ciencia de nuevas herramientas capaces de manipular y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados; los mamíferos. El desarrollo de nuevas biotecnologías para producir animales transgénicos o para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de fecundación *in vitro* y en el cultivo de embriones. La última década del siglo pasado se caracterizó por ser un período relevante para el mejoramiento de la manipulación reproductiva y genética de los animales. Así mismo; en la actualidad vivimos la era de la clonación y la transgénesis, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas (Peláez, 2011).

Una herramienta valiosa, que aporta al desarrollo de la biotecnología, es la producción *in vitro* de embriones bovinos (PIVE). Esta herramienta es utilizada como base por otras investigaciones. Como complemento a esta tecnología se vienen desarrollando otros como el uso de cocultivos. Estos sistemas se fundamentan en los procesos fisiológicos que ocurre *in vivo* (Peláez, 2011).

La PIVE comprende básicamente tres pasos: 1) la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos obtenidos de ovarios por medio de aspiración folicular, 2) la fecundación *in vitro* (FIV) y 3) el cultivo *in vitro* (CIV) de los embriones producidos (Urrego *et al.*, 2008). Estos tres pasos involucran una serie de procesos fisiológicos relacionados entre si, donde juega un papel importante la interacción que existe entre el óvulo y las células del *cúmulus oophorus* (CC) (Ferré y Cattaneo, 2013). Se considera además que el parámetro utilizado para medir la eficacia de la producción *in vitro*, es la calidad de los blastocistos y la tasa alcanzada de los mismos (Ahuja *et al.*, 2009).

En la actualidad, la PIVE sigue con los mismos valores desde décadas atrás. Sumado a ello, la calidad de los embriones PIVE continúan siendo inferior a los producidos *in vivo*. Por ello se crea la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo que mejoren los parámetros actuales.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar la influencia de un sistema de cocultivo con células del *cúmulus oophorus* en la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Determinar la influencia de un sistema de cocultivo con células del *cúmulus oophorus* en la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de maduración *in vitro*.
- Identificar el número de embriones viables desde mórula hasta blastocisto expandido obtenidos *in vitro*.
- Evaluar la acción enzimática de los embriones viables desde mórula hasta blastocisto expandido obtenidos *in vitro*.

### III. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

#### 3.1. Antecedentes de la investigación

La producción de embriones *in vitro* (PIVE) es modelo de múltiples investigaciones. Si bien es cierto casi el 90% de los ovocitos llegará a la metafase II (MII), sólo el 80% podrá ser fecundado y comenzar a dividirse al menos hasta 2 y 4 células (Mucci *et al.*, 2006). Lamentablemente, no todos podrán alcanzar la etapa de blastocisto. Es por ello, que la tasa generalmente oscila entre 5 y 30% (Ahuja *et al.*, 2009).

Estos porcentajes bajos indican un estado crítico en la PIVE y en la calidad de los blastocistos, ya que son de menor calidad a los producidos *in vivo*. Además, en comparación con los *in vivo*, los embriones PIVE muestran numerosas diferencias estructurales a nivel morfológico, cromosomal, funcional y metabólica con alteraciones en la expresión génica y por ende con mayor incidencia de apoptosis (Hirayama *et al.*, 2014; Vafaye *et al.*, 2014).

Los resultados alcanzados en la PIVE apuntan a la necesidad de realizar nuevos estudios sobre los medios de cultivo, utilizando nuevos medios o valiéndose de los existentes con la participación de células somáticas (cocultivos). Un sistema de cocultivo implica la utilización de células somáticas en el medio de cultivo y también unidas a los embriones para mejorar el ambiente de cultivo con el objetivo de obtener mejores tasas de desarrollo durante el cultivo *in vitro* (CIV). En la búsqueda por mejorar el sistema de CIV, el cocultivo demostró ser una buena alternativa. Este sistema, reporta que mejora el ambiente de cultivo tradicional, **permitiendo** alcanzar embriones con estadios de desarrollo avanzados como mórulas y blastocistos (Lorenzini, 1997).

Los sistemas de cocultivo usados con más continuidad son los que emplean las CC (Bousquet *et al.*, 1999) y células del epitelio oviductal bovino (CEOB) (Reed *et al.*, 1996). Hasta hoy, los resultados son diversos dependiendo de las células empleadas. Se logran porcentajes de 24,2% de blastocistos cocultivados con células foliculares (Kamishita *et al.*, 1999). Más aún se observó que las células epiteliales no solo mejoran la tasa, sino también la calidad de embriones bovinos (Cordova *et al.*, 2014).

Se sabe también que el uso de CEOB ayudan a superar el bloqueo durante las divisiones celulares permitiéndoles alcanzar estadios de mórula y blastocisto. En cuanto a las células del *cúmulus*, estas son consideradas un subtipo de células de la granulosa (CG) que cumplen funciones de soporte nutricional de los ovocitos, secretan hormonas esteroideas (Canipari, 1994), e inducen la reacción acrosómica (RA) (Mattioli *et al.*, 1998).

Staigmiller y Moor (1984), observaron que cocultivos con CC aumentaron la capacidad de desarrollo del embrión. El mecanismo de acción fisiológico de las CC se da durante la PIVE. Las CC parecen tener propiedades embriotróficas según lo han indicado Vansteenbrugge *et al.* (1994), ya que producen sustancias que incrementan el desarrollo de los embriones bovinos. Mulheron y Schomberg (1992), observaron que la secreción en el medio de cultivo de uno o más de estos factores o una combinación de ellos podrían ser responsables del efecto benéfico de este cocultivo sobre el desarrollo embrionario. Se reportaron mejoras en la tasa de PIVE a 38.5% de mórulas compactas y 18.5% de blastocistos cocultivados con CC, comparado a un 31.9% de mórulas compactas y 38.5% de blastocistos cocultivados con CEOB (Martínez, 2014; Muci, 2000).

Otro de los factores que podría ser determinante en la PIVE, es el uso de gases. Se reportó una producción del 6.3% de blastocisto cocultivado con CC en un ambiente con oxígeno (Goovaerts *et al.*, 2009).

La PIVE también puede estar en función a la maduración del óvulo. Dey *et al.* (2012) encontraron que el uso de cocultivos con CC promueve el aumento de la maduración nuclear y citoplásmica, la prevención del endurecimiento de la zona pelúcida (ZP) y las tasas de FIV.

Se sabe que para mejorar la calidad de los embriones PIVE, estos deben ser producidos en un ambiente que imite a los sistemas *in vivo*. Efectivamente, al trabajar con un sistema de cocultivo para estudiar los procesos fisiológicos durante el desarrollo de los embriones, es apropiado elegir células provenientes de órganos donde estos eventos ocurren *in vivo* (Rexroad y Powell, 1988).

La determinación de la calidad esta en función a multiples variables. Ellington *et al.* (1990) señalan que la calidad de embriones bovinos se determina en función a su morfología, número de células por embrión, calidad de células y sus núcleos.

La culminación del crecimiento del ovocito y su calidad esta íntimamente relacionado con la capacidad de ser fecundado. Un ovocito que alcanza su crecimiento total esta rodeado por procesos citoplasmáticos de las CC que atraviesan la ZP y terminan en la membrana plasmática del ovocito mediante uniones estrechas de tipo Gap (Amleh y Dean, 2002). Estas uniones permanecen durante el crecimiento y diferenciación del ovocito sirviendo de mediador en la transferencia de nutrientes, precursores metabólicos (como aminoácidos y nucleótidos) y moléculas de señalización como hormonas y factores de crecimiento (Figura N° 01) (Van den Hurk y Zhao, 2005).

## **3.2. Bases teóricas**

### **3.2.1. Características de los ovocitos de bovino**

La recuperación de gametos es una alternativa para obtener un mayor porcentaje de embriones, los ovarios pueden ser obtenidos de animales vivos o de centros de faenado (Aller *et al.*, 2015).

Cuando se utilizan ovarios procedentes de centros de faenado, se tiene que hacer una selección de folículos antes de iniciar con el procedimiento de colecta, pues en base a una serie de parámetros se puede determinar en cierta medida la competencia ovocitaria (Zarate, 2006). Uno de los parámetros a considerar al hacer aspiración folicular, es el tamaño del folículo del cual procederán los ovocitos; aquellos que procedan de folículos pequeños son menos competentes que los que proceden de folículos de 2 a 6 mm de diámetro (Raghu *et al.*, 2002). Por otra parte, la edad de la hembra de la cual proceden los ovocitos también influirá sobre los resultados: los ovocitos de donadoras jóvenes son menos competentes que los de las hembras adultas (Amstrong, 2001).

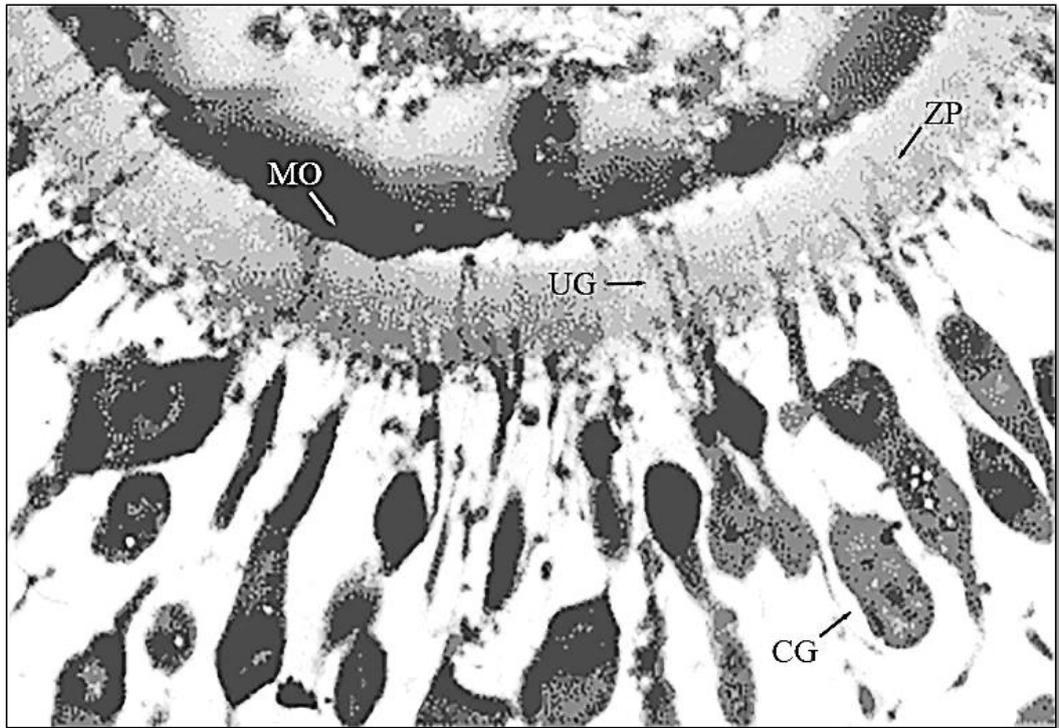


Figura N° 01 Zona pelúcida y uniones Gap

Se observa en un corte semifino, las prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa (CG) conocidas como uniones gap (UG) que atraviesan la zona pelúcida (ZP), los mismos que se encuentran en íntimo contacto con la membrana ovocitaria (MO).

Fuente: Moor, 1983.

También es fundamental realizar una evaluación de los factores ambientales involucrados en la manipulación de los ovocitos como la temperatura de almacenamiento de los ovarios, el tiempo de recolección y transporte de los mismos ya que estos pueden afectar la capacidad de los ovocitos para producir embriones, reflejado en tasas de fecundación y división embrionaria (Merton *et al.*, 2003). La colecta de ovocitos obtenidos de ovarios de animales faenados se puede hacer mediante el corte de ovarios (slashing) y la aspiración de folículos superficiales mayores de 2 mm de diámetro con una jeringa de 5 a 10 ml y una aguja estéril calibre 18 (Fernández *et al.*, 2010).

La valoración de la calidad de los ovocitos está basada en su morfología. Un ovocito con morfología “normal” y de buena calidad es aquel que presenta: una ZP bien definida; ya que esta evita la polispermia y protege al óvulo del medio externo. Además, debe poseer un espacio perivitelino en el que cabe el corpúsculo polar de forma esférica. También debe poseer un citoplasma homogéneo y oscuro, ya que se ha demostrado que la coloración esta relacionada con el contenido de lípidos y un buen potencial de desarrollo comparado a aquellos con una coloración pálida. Por otro lado, cuando los ovocitos presentan una coloración negra significa que estos están viejos y que su potencial de desarrollo es muy bajo (Matorras y Hernández, 2007).

La presencia de CC también es importante. Las capas de CC deben ser compactas; con una fuerte conexión con enlaces gap, entre las CC y el ovocito. Esta conexión es importante para el intercambio de los factores responsables durante la maduración citoplasmática (Quian *et al.*, 2003), y el aporte a los ovocitos de los aminoácidos necesarios para el crecimiento como también la mayor parte de los ribonucleótidos y ribonucleósidos necesarios durante la maduración (Hiroyuki *et al.*, 2000).

Los ovocitos recuperados pueden ser clasificados en cuatro categorías. Los ovocitos categoría A (excelentes); presentan citoplasma oscuro y uniforme, combinado con tres o más capas compactas de CC. Los ovocitos categoría B (buenos); presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa, pero menos de tres capas del *cúmulus*. Los ovocitos categoría C (regulares); presentan

una pérdida de la uniformidad del citoplasma, con la corona radiada incompleta y parcialmente o sin capas del *cúmulus*. Finalmente, los ovocitos categoría D (degenerados); presentan citoplasma no homogéneo o fragmentado con células de la corona y del *cúmulus* disgregadas o ausentes en su totalidad, siendo la categoría A y B los aptos para la MIV (Senatore *et al.*, 2010).

Los ovocitos que presentan un *cúmulus oophorus* compacto tienen mayores porcentajes de maduración, fecundación y desarrollo embrionario que los que solo presentan corona radiada (Stojkovic *et al.*, 2001).

### **3.2.2. Maduración del ovocito**

La maduración del ovocito; dividida en maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente (Martínez, 2002).

El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio de los niveles de gonadotropinas, en especial de LH. Además de la reanudación de la meiosis, el pico de la LH desencadena cambios en el complejo *cúmulus*-ovocito (COCs) (Conti *et al.*, 2006).

#### **A) Maduración citoplasmática**

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

Se afirma que la maduración citoplasmática se lleva a cabo mediante la redistribución de las organelas citoplasmáticas, los cambios en la dinámica de los filamentos del citoesqueleto y una reprogramación de la síntesis proteica. La redistribución de las mitocondrias en la región periférica al citoplasma interno. Una falla en esta redistribución produce una incompleta maduración citoplasmática y una reducción en el desarrollo de la competencia (Liu *et al.*, 2010).

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

## **B) Maduración nuclear**

La maduración nuclear comienza con la reanudación de la meiosis. El paso de vesícula germinal (VG) a metafase de la segunda división meiótica (MII) conlleva a la disolución de la membrana nuclear conocida como “rotura de la vesícula germinal”, la formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I (MI); para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la formación del primer corpúsculo polar (CP) y el paso del ovocito al estadio de MII (Richard, 2007). La maduración nuclear culmina con la fusión de membranas entre el ovocito y el espermatozoide dando origen a la formación de los pronúcleos masculino y femenino (Gordon, 2003).

### **3.2.3. Maduración *in vitro***

La maduración es un fenómeno complejo durante el cual el ovocito va progresando desde el estadio de VG hasta la MII, alcanzando con ello la competencia meiótica (González y Gil, 2004); este proceso puede llevarse a cabo de manera artificial mediante la incubación de los ovocitos recuperados por aspiración folicular postmortem o a través de ovum pick-up (OPU), en un medio adecuado que le brinde un ambiente estimulante para completar su maduración.

El éxito de la MIV depende de la técnica de recuperación de los ovocitos y la selección apropiada de éstos. Por otro lado, el tamaño de los folículos del cual se obtienen es sumamente importante, pues aquellos ovocitos procedentes de folículos menores de 2 mm no están aptos para su maduración y posterior fecundación y los

ovocitos mayores a 6 mm de diámetro poseen menor capacidad de competencia de desarrollo, ya que en su mayoría se encuentran en una etapa de dominancia o en proceso de degeneración (González y Gil, 2004).

Durante la maduración del ovocito se dan una serie de cambios importantes a nivel nuclear, citoplasmático y de las envolturas (De los Reyes *et al.*, 2011). La expansión de las CC es un signo de maduración que facilita la reacción acrosómica como también la penetración de los espermatozoides por la ZP (Otoi *et al.*, 2007).

Bajo condiciones *in vitro*, la maduración nuclear y citoplasmática se ha realizado con distintos protocolos. Entre los medios empleados se pueden citar el TCM-199, Ham's F-10, Ham's F-12 y MEM, entre otros (Mattioli *et al.*, 1989), de los cuales el más utilizado es el TCM -199. Todos estos medios presentan una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador en diferentes concentraciones (Gliedt *et al.*, 1996).

A estos medios se les da una suplementación con sueros, como suero fetal bovino (SFB), suero de albumina bovina (SBA), y factores de crecimiento (EGF, IGF-I, IGF-II, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  y activina) que favorecen la expansión de las CC y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis; mediados por receptores presentes en las CC. Además favorecen la maduración de los ovocitos y actúan como agentes mitogénicos sobre las CG (Lee *et al.*, 1996).

La expansión de las CC se da por la secreción de ácido hialurónico, esta secreción provoca la interrupción de las uniones gap. La expansión de las CC es iniciada por acción hormonal de la FSH que promueve el intercambio de los factores de maduración entre las CC y el ovocito, la FSH también induce a las CG a sintetizar y liberar cantidades crecientes de estrógeno que aumentan el número de receptores para la LH. De este modo, estimulando la MIV, favoreciendo las tasas de fecundación *in vitro*; los estrógenos favorecen el desarrollo de los futuros embriones y las progesteronas tienen una acción positiva elevando la tasa de maduración y fecundación *in vitro* (First y Parrish, 1987).

Así mismo con el afán de optimizar la MIV es importante tener en consideración el ambiente apropiado que le permita generar los procesos biológicos necesarios (temperatura, presión osmótica, pH y atmósfera del incubador) para completar la maduración nuclear y citoplasmática (Yang *et al.*, 1998).

Las temperaturas para la MIV pueden variar entre 37 °C a 39 °C. Sin embargo, cultivos realizados por debajo de 5 °C afecta la MIV (Shi *et al.*, 1998; Azambuja *et al.*, 1998).

La presión osmótica también debe tenerse en cuenta durante la MIV. Este debe oscilar entre 265 y 325 mOsM. Los medios generalmente utilizados tienen osmolaridades cuyos valores oscilan entre 285 y 295 mOsM (Del Campo, 1993).

El pH también es considerado importante, debe mantenerse entre 7.2 y 7.4 (Brackett, 1981; Phillips, 1988). Dentro de los medios se encuentran el bicarbonato de sodio y el rojo fenol, estos dos compuestos mantendrán el pH balanceado e indicarán un cambio brusco en él respectivamente. Otra manera de equilibrarlo es a través del CO<sub>2</sub> en el incubador (Lu *et al.*, 1987) o a través de las mezclas de gases a diferentes concentraciones como 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N (Takahashi *et al.*, 1996).

#### **3.2.4. Características del espermatozoide bovino**

La espermatogénesis es un proceso complejo y dinámico por el que se generan los espermatozoides. Este fenómeno se encuentra sujeto a una fuerte regulación hormonal (FSH, LH, testosterona y 17β-estradiol) e incluyen cuatro eventos celulares importantes: 1) Espermatogoniogénesis, proceso continuo que involucra la división de las espermatogonias “A” que mantienen el *pool* de células madre y la posterior producción de espermatogonias “B” para la producción de espermatozoides; 2) Diferenciación del espermatocito primario a partir de la espermatogonia “B” (última división mitótica) y la diferenciación de éste a espermatocito secundario y finalmente a espermátidas; 3) Espermiogénesis, proceso por el cual las espermátidas sufren morfogénesis para convertirse en un espermatozoide maduro y móvil y 4) Espermiación que consiste en la liberación de la espermátida elongada o espermatozoide que es el producto final de la espermatogénesis, hacia la luz tubular (Kopera *et al.*, 2010).

Los espermatozoides derivan de las células germinales primordiales (CGP) que se encuentran presentes durante el desarrollo fetal (Phillips *et al.*, 2010).

El espermatozoide de mamífero es el producto final del proceso de la gametogénesis en el macho. Es una célula con movimiento activo constituida por una cabeza y flagelo móvil o cola formada por cuello, pieza media, pieza principal y filamento terminal (Guzmán *et al.*, 2007)

La cabeza del espermatozoide contiene el núcleo con la cromatina fuertemente condensada y el acrosoma rodeado por una moderada cantidad de componentes del citoesqueleto y citoplasma. El acrosoma es una gran vesícula secretora que se encuentra localizada en el extremo anterior de la cabeza espermática. Se origina a partir del complejo de Golgi durante el estadio de espermátide y contiene enzimas para la penetración de la cubierta del ovocito. De estas enzimas la hialuronidasa y la acrosina juegan un rol central durante la dispersión de las CC provocando la lisis local de la ZP. Este acrosoma posee una membrana interna que rodea la porción anterior de la membrana nuclear y que se continúa ininterrumpidamente formando la membrana externa, la cual se extiende cerca de la superficie interna de la membrana plasmática de la porción anterior de la cabeza. El acrosoma posee dos segmentos, el casquete acrosómico o acrosoma anterior y el segmento ecuatorial por el cual el espermatozoide hace contacto con el ovocito en el momento de la fecundación (Figura N° 02). Durante la reacción acrosómica la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide se fusionan formando vacuolas en la superficie que permiten la salida del contenido acrosomal; la cola de los espermatozoides se encuentra constituida por varios componentes funcionalmente dependientes entre si. La cola puede dividirse en cuatro segmentos: el cuello, la pieza media, la pieza principal y la pieza final, todas ellas rodeadas por una membrana plasmática común (Figura N° 03) (Bedford, 2008).

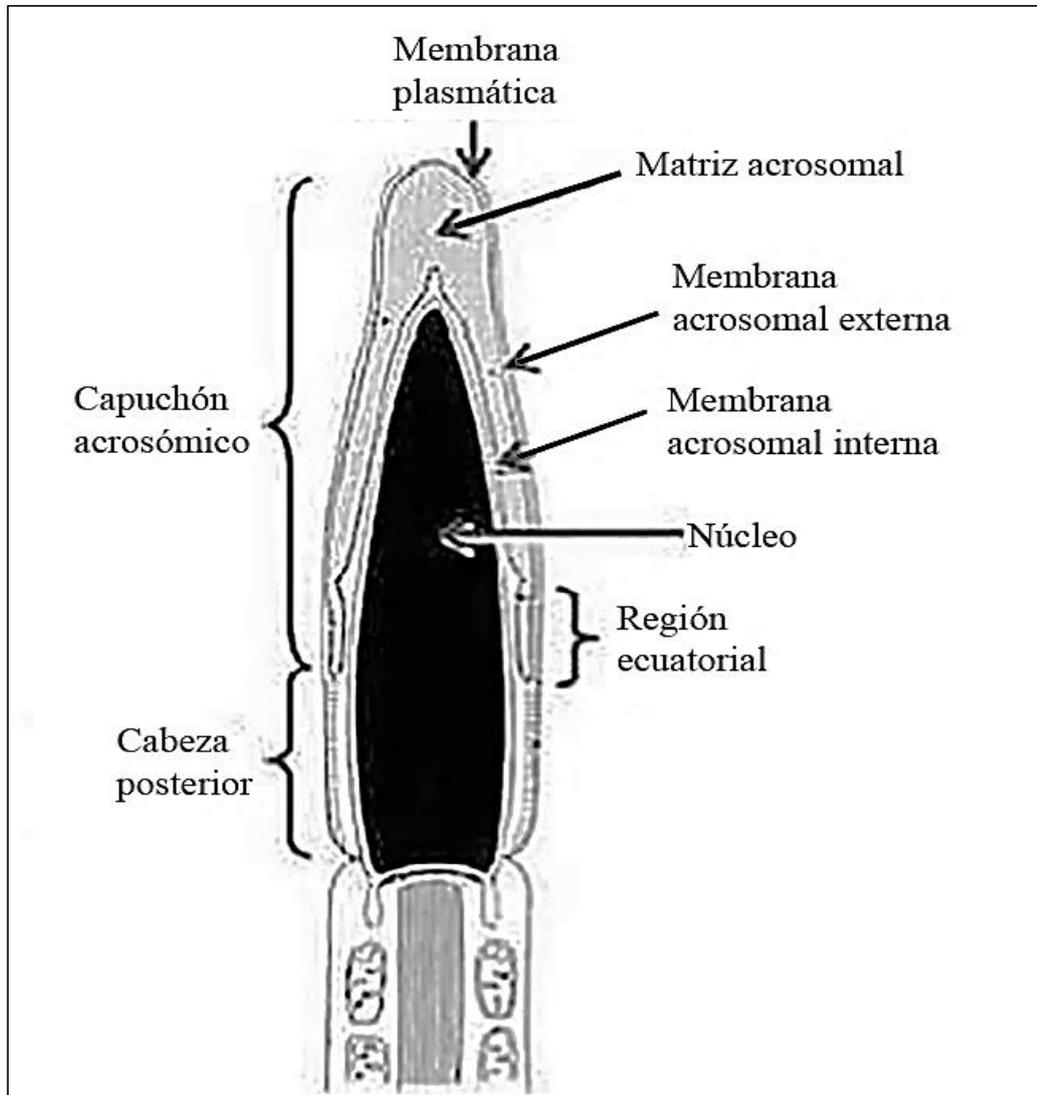


Figura N° 02 Organización de la cabeza del espermatozoide

Fuente: Florman y Ducibella, (2006).

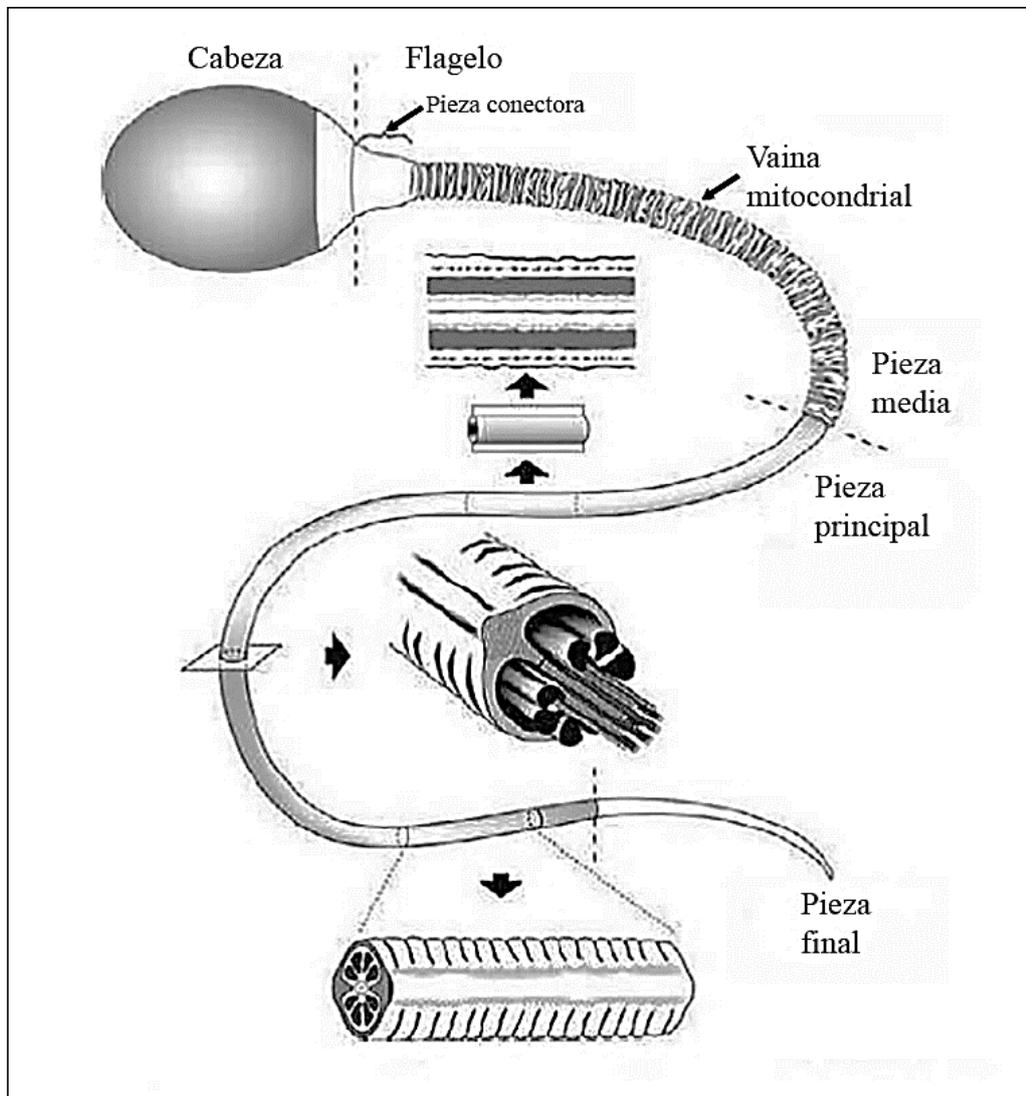


Figura N° 03 Características generales del espermatozoide

Fuente: Eddy, (2006).

### 3.2.5. Capacitación espermática

Los espermatozoides que han atravesado el epidídimo aún no han completado el proceso de maduración funcional, por lo que continúan siendo limitados en su capacidad fecundante (Florman y Ducibella, 2006). Durante la eyaculación, el espermatozoide entra en contacto con las secreciones de las glándulas genitales accesorias y alcanza el aparato genital femenino. En condiciones *in vivo*, durante la migración de los espermatozoides por el aparato reproductor de la hembra, ocurre la capacitación espermática (CE) bajo la influencia de agentes capacitantes como la heparina o el ácido hialurónico (Romar, 2001).

Los espermatozoides de los mamíferos sufren una serie de cambios bioquímicos y biofísicos antes de la fecundación, denominados CE; para la FIV es necesario llevar a cabo dicho proceso de forma artificial, por lo que los espermatozoides serán sometidos a un procedimiento de selección, en el cual sólo los de mejor calidad y motilidad serán separados del plasma seminal, de los espermatozoides muertos o inmóviles y, de los diluyentes y crio protectores (Urrego *et al.*, 2008; Wani, 2002).

La CE radica en alteraciones de la membrana plasmática, tales como la expulsión de los factores inhibidores de la capacitación y la eliminación del colesterol, la entrada de  $Ca^{++}$  a la célula, el aumento del pH intracelular y el aumento de la fosforilación proteica, así como la hiperpolarización de la membrana. (Schatten *et al.*, 2008).

Entre los principales métodos de capacitación *in vitro* se encuentra el swim-up, en el que se seleccionan los espermatozoides en función a su motilidad. El semen es depositado en el fondo de un tubo de ensayo con el medio adecuado, luego es incubado por espacio de 1 h y sólo los de mejor motilidad nadan hacia arriba, de tal manera que al momento de retirar el contenido de la parte superior del tubo se seleccionan los espermatozoides vivos y con motilidad rectilínea progresiva (Urrego *et al.*, 2008). El método de gradientes de Percoll, es aplicado para la separación de células por densidad y centrifugación. Los espermatozoides son seleccionados según su velocidad potencial y densidad, de manera que aquellos motiles migran de las zonas de menor densidad hacia las de mayor densidad, sin causar ninguna alteración en su viabilidad (Guimarães *et al.*, 2014).

El evento final de la capacitación es la reacción acrosómica, gracias a la cual se puede llevar a cabo la fusión de las membranas del ovocito y del espermatozoide. (De Mattos, 1999).

### **A) Hiperactivación**

Los espermatozoides sufren además de la motilidad progresiva, adquirida durante la maduración epididimal, un tipo de movimiento violento llamado motilidad progresiva. La motilidad progresiva se caracteriza por un movimiento flagelar vigoroso, de baja amplitud y larga longitud de onda y relativamente simétrico que da como resultado un rápido movimiento de avance lineal. El movimiento de hiperactivación, se caracteriza por movimientos flagelares como golpes de látigo, de alta amplitud y baja longitud de onda, asimétricos, y con una trayectoria de avance circular o irregular (Florman y Ducibella, 2006).

El fenómeno de hiperactivación se produce durante el proceso de capacitación, pero no se ha determinado aún con exactitud si la hiperactivación es una consecuencia de la capacitación o si ambos son procesos independientes que se producen de forma simultánea. Este fenómeno de hiperactivación serviría en primer lugar para facilitar el avance del espermatozoide a través del fluido viscoso del oviducto, así como también, a través de la matriz extracelular del *cúmulus* y de la ZP. En segundo lugar, la hiperactivación ayudaría al espermatozoide a ascender por el oviducto hasta el sitio de fecundación al permitir que éste se libere de la adhesión transitoria ejercida entre la gameta y el epitelio oviductal (Florman y Ducibella, 2006).

### **B) Hiperactivación *in vitro***

La penetración del *cúmulus* y la reacción acrosómica son dos procesos que van acompañados por fuertes movimientos del flagelo del espermatozoide denominados movimientos hiperactivos. Estos movimientos, se producen cuando los espermatozoides se ponen en contacto con el medio de capacitación. Los cambios que se producen en la membrana plasmática durante la capacitación, hacen que las cabezas de los espermatozoides se desaglutinen durante la incubación, aproximadamente a las 2 h. Después de que se

desaglutinan, nadan libremente mostrando movimientos del flagelo de amplitud cada vez mayor, trazando figuras que asemejan a un ocho, para terminar con un movimiento de avance lineal. La hiperactivación *in vitro* se puede inducir por agentes capacitantes como la heparina, cafeína, epinefrina, entre otros (Suarez, 2008).

### **C) Reacción acrosómica**

La reacción acrosómica (RA) consiste en la fusión de la membrana citoplasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza espermática, lo que da origen a la liberación de las enzimas almacenadas en esta vesícula y la consiguiente exposición de la membrana acrosomal interna (Cardona *et al.*, 2006). El material lítico liberado desde el acrosoma digiere o disocia la cobertura glicoproteica conocidas como ZP del ovocito, generando un orificio por el cual el espermatozoide avanza hasta alcanzar la membrana citoplasmática del ovocito (Figura N° 04) (Yanagimachi, 2011).

El sitio en el ovocito donde el espermatozoide comienza con la RA ha sido, por muchos años objeto de controversia, Recientemente, Jin *et al.* (2011) por medio de la grabación en video de FIV en ratón descubrieron que la mayoría de los espermatozoides presentan RA cuando se encuentran en el *cúmulus*, mientras unos pocos lo hacen cuando alcanzan la ZP (Yanagimachi, 2011). Esto coincide con lo observado en espermatozoides de cobayos, los cuales son capaces de unirse y penetrar la ZP luego de experimentar la RA.

Sin embargo, en muchas especies la fecundación *in vitro* es posible aún sin un *cúmulus oophorus* intacto, por lo que indudablemente la ZP tiene la habilidad de inducir o acelerar este fenómeno, aunque no puede ser considerada la única estructura capaz de desencadenarlo (Jin y col., 2011; Yanagimachi, 2011).

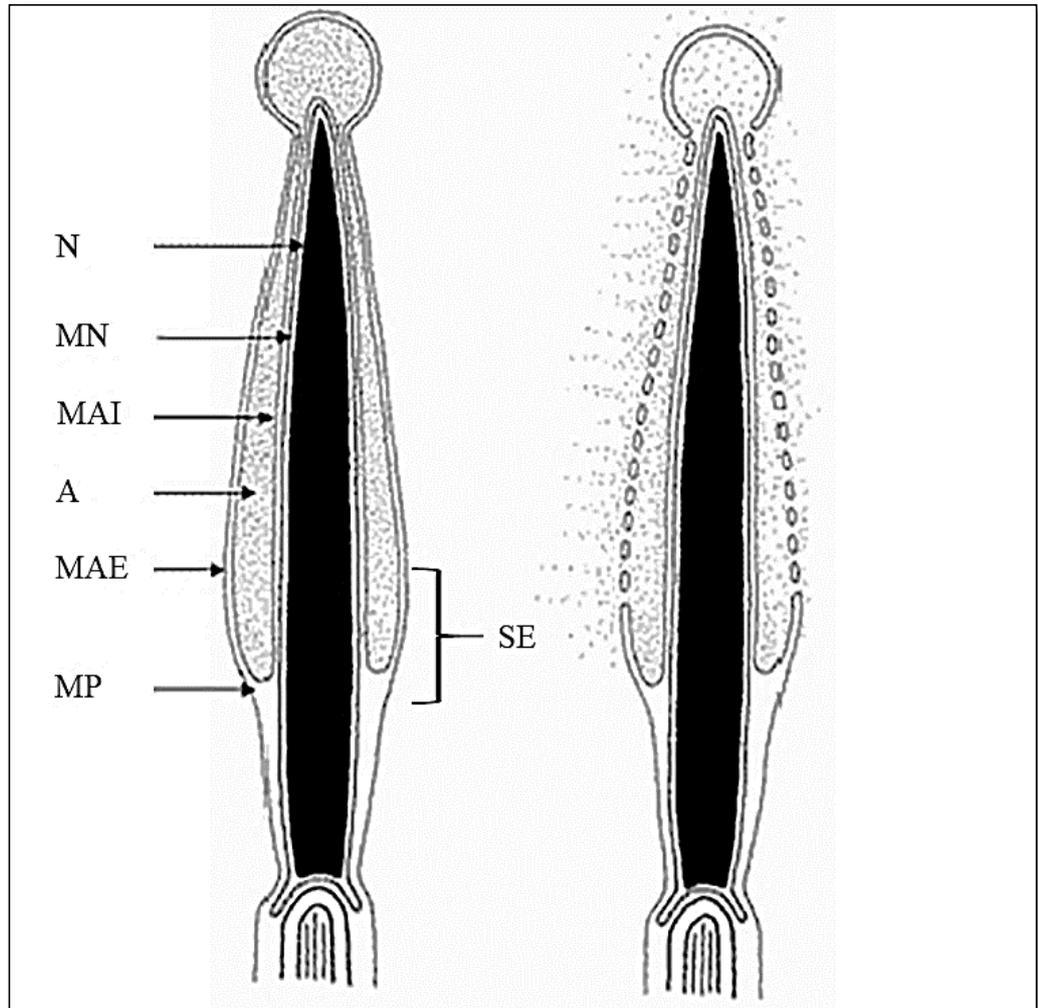


Figura N° 04 Esquema de la reacción acrosómica

Cabeza espermática antes de la reacción acrosómica: (N) núcleo, (A) acrosoma, (MAI) membrana acrosómica interna, (MAE) membrana acrosómica externa y (MP) membrana plasmática. Nótese la posición del segmento ecuatorial (SE). 2. cabeza espermática durante la reacción acrosómica sobre la membrana pelúcida (MP). La fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa resulta en la formación de vesículas. El segmento ecuatorial no fue afectado por la reacción acrosómica. Fuente: Hyttel *et al.*, (1989).

### 3.2.6. Fecundación *in vitro*

Luego de la reacción acrosómica el espermatozoide pierde el contenido acrosomal quedando expuesta la membrana acrosomal interna. Ésta se encuentra fusionada a la membrana plasmática de la región posacrosomal de la cabeza del espermatozoide, formando el segmento ecuatorial. Es por este segmento, donde comienza la fusión de las membranas plasmáticas entre ambos gametos (Elder y Dale, 2011).

La ZP contiene tres proteínas (ZP1, ZP2, ZP3), estas actúan como receptores primarios y secundarios para que se dé la unión de la ZP y el espermatozoide. En primera instancia para que se de la unión de gametos, la ZP3 se une al espermatozoide, con baja afinidad es decir se da una reacción primaria. De tal manera que esto provoca la reacción acrosómica, donde la membrana acrosomal externa del espermatozoide se une con la membrana plasmática del ovocito (Sepúlveda, 2008). Luego la membrana acrosomal interna interactúa con la proteína ZP2 produciendo así una reacción secundaria, los espermatozoides se activan liberando calcio intracelular, que lleva a la liberación de vesículas acrosómicas que contienen hialuronidasa y acrosina, estas enzimas permiten que el espermatozoide sea capaz de atravesar la ZP y llegar al espacio perivitelino (Boiso *et al.*, 2003), donde la membrana plasmática postacrosomal se fusiona con la membrana plasmática del ovocito, y de esta manera el espermatozoide se incorpora al citoplasma (Sepúlveda, 2008).

Según Ordóñez (2005), el tiempo de FIV entre ovocitos y espermatozoides, es importante para el desarrollo de los embriones; un tiempo demasiado prolongado puede ser perjudicial, debido a la producción de radicales de oxígeno, además de un aumento en las tasas de poliespermia. El tiempo habitual de FIV oscila entre 18 h y 24 h, periodo en el que se han obtenido resultados satisfactorios.

La unión de los espermatozoides activa al ovocito, lo que permite que este sea capaz de completar la MII y formar el segundo CP (Boiso *et al.*, 2003), a partir del material genético haploide del espermatozoide y del ovocito se van a formar los pronúcleos, que migran al centro de la célula. Durante la migración el ADN se duplica y ocurre la singamia, donde la membrana de los pronúcleos se rompe y los

cromosomas se ensamblan en el huso mitótico, y así ocurre el primer clivaje del nuevo individuo (Figura N°05) (Sepúlveda, 2008).

### **3.2.7. Cocultivo y desarrollo embrionario**

Los embriones de los mamíferos pueden ser cultivados bajo un sinnúmero de condiciones; sin embargo, los resultados en cuanto a la viabilidad de los blastocistos pueden ser extremadamente diferentes; por lo que la viabilidad desde este punto está definida como la habilidad del blastocisto para implantarse y desarrollar exitosamente hasta un feto (Cordova *et al.*, 2014; Gardner y Lane, 2014).

Además, al igual que ocurren cambios en la fisiología y metabolismo del embrión, el ambiente en el sistema reproductivo femenino también sufre un flujo de cambios, ya que en diferentes regiones del tracto reproductivo ocurren cambios endocrinos, específicamente en el oviducto y el útero (Gardner y Lane, 2014; Schmaltz *et al.*, 2014). Con el fin de asimilar estos cambios de manera artificial se emplean el cocultivo de los embriones con células somáticas (oviducto, granulosas, uterinas), pues, aunque la manera en la que contribuyen al desarrollo embrionario es desconocida, se han establecido hipótesis que describen posibles mecanismos que originan efectos benéficos sobre la PIVE.

Entre éstas se puede mencionar, la producción de compuestos con actividad mitogénica para las células embrionarias que favorecen la diferenciación celular, la eliminación o degradación de algunas sustancias embriotóxicas presentes en el medio de cultivo, así como la modificación en las concentraciones de algunos sustratos energéticos. No obstante, existen evidencias que indican condiciones inapropiadas en el ambiente de cultivo (cambios en la composición del medio por alteraciones en los constituyentes, modificaciones en la atmósfera gaseosa, etc.) que conllevan a la liberación de sustancias embriotóxicas (Cordova *et al.*, 2014).

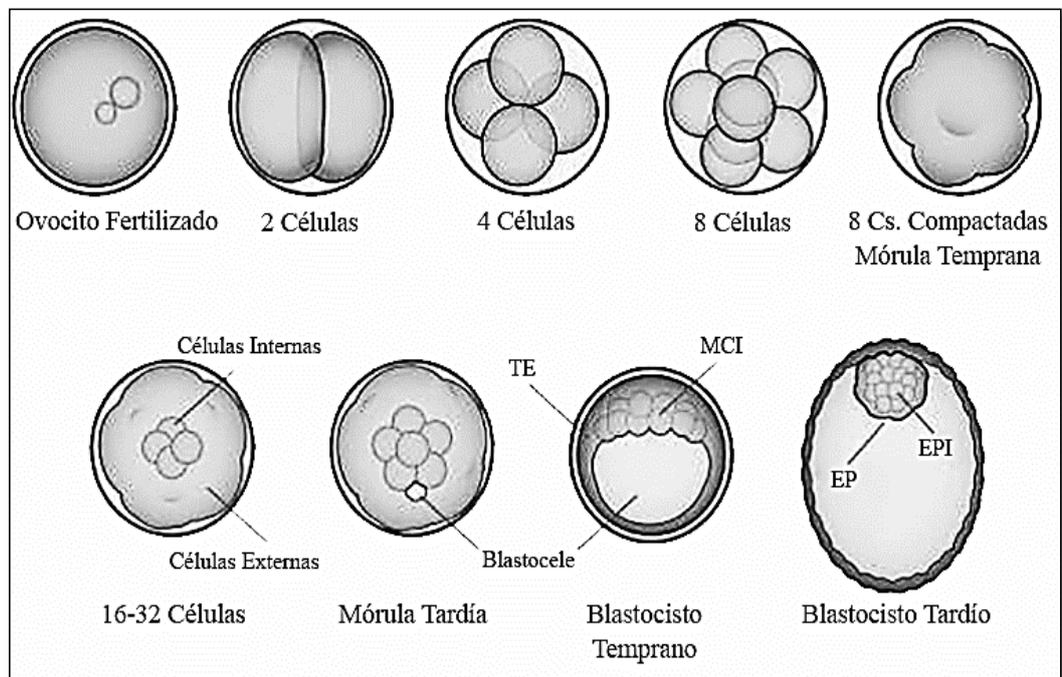


Figura N° 05 Estado de desarrollo y valoración morfológica

Luego de tres clivajes se alcanza el estadio embrionario de 8 células. Las células embrionarias de los estadios de 8 células o mórula temprana se compactan unas con otras hasta que sus bordes celulares se vuelven invisibles. Las subsecuentes divisiones conducen al estadio de mórula tardía, donde se establecen dos tipos celulares diferentes: células internas y externas. Durante el estadio de mórula tardía aparece el blastocele. La expansión de esta cavidad continúa a través de los estadios de blastocisto temprano y tardío. En el estadio de blastocisto aparecen dos linajes celulares bien distintos: el trofoectodermo (TE) (derivado de las células externas) y el macizo celular interno (MCI) (derivado de las células internas). El TE también se encuentra presente en el blastocisto tardío, pero el MCI se divide en el epiblasto (EPI) y el endodermo primitivo (EP). Fuente: Valoración morfológica según IETS, (2010).

### **A) Células del *cúmulus oophorus***

El *cúmulus oophorus* es un grupo de células que rodean al ovocito tanto en el folículo ovárico como después de la ovulación. Está compuesto por CC y la matriz extracelular laxa. Contiene principalmente ácido hialurónico polimerizado conjugado con proteínas de bajo peso molecular secretada por las células foliculares durante la reanudación de la meiosis, causando una rápida expansión del *cúmulus* poco antes de la ovulación; el grupo celular que se encuentra más cercano al ovocito es llamado corona radiada (Marei *et al.*, 2012).

Las CC son indispensables para el correcto desarrollo del ovocito y para que este sea capaz de adquirir desarrollo de competencia, además se ha visto que presentan beneficios durante el proceso de MIV (Herrera, 2012).

Durante el proceso de maduración del ovocito, se produce una transformación morfológica del *cúmulus*, siendo esta una expansión del mismo (Eppig, 1979), la expansión del *cúmulus* disminuye el número de uniones estrechas provocando un descenso de acoplamiento iónico y de la cooperación metabólica entre el ovocito y estas células (Schultz, 1991).

Por lo tanto la presencia de las CC alrededor del ovocito es fundamental para lograr una maduración citoplasmática ya que es una fuente de energía (Johnson *et al.*, 2008). Ge *et al.* (2008) concluyeron que ovocitos cultivados con CC, demuestran un desarrollo similar al que presentan ovocitos madurados *in vivo* con respecto al tiempo de maduración, redistribución de los gránulos corticales y la redistribución de las mitocondrias.

### **B) Características de las células del *cúmulus oophorus***

Durante la maduración del ovocito, se da una interacción cercana entre el ovocito y las CC que le rodean, estas células soportan la maduración e incrementan la maduración citoplasmática, responsable de llevar a cabo una fecundación “normal” y el subsecuente desarrollo embrionario. Las CC durante la maduración *in vitro* se ha demostrado que sufren apoptosis y contribuyen a proteger al ovocito del estrés oxidativo inducido a su vez por la apoptosis, algo que no ocurre *in vivo* (Lin *et al.*, 2009).

Se ha observado que, al realizar cultivos de CG *in vitro*, es importante tomar en cuenta la densidad de las placas, ya que juegan un papel crítico para la diferenciación; pues a menor densidad hace que las células granulosas muestren una producción de estrógenos, mientras que una mayor densidad hace aparecer progesterona, como la producida por células de la teca luteínica (Shirazi y Moalemian, 2007).

Entre las funciones del *cúmulus oophorus* se encuentra la protección del ovocito, la coordinación del desarrollo folicular y la maduración del ovocito. Este último, relacionado con la regulación del transporte de aminoácidos, la síntesis de esteroides sexuales y la transcripción génica del ovocito; otras funciones son la de proveer metabolitos energéticos para la reanudación de la meiosis al promover el proceso de glicolisis (metaboliza la glucosa a piruvato y la transfiere al ovocito) o al transportar el colesterol sintetizado (para producción de lípidos) (Dey *et al.*, 2012).

### **3.2.8. Cultivo *in vitro***

Luego de la fecundación, la membrana nuclear del espermatozoide se rompe, se produce la sustitución de protaminas por histonas, la cromatina se descondensa y se forma una nueva membrana nuclear, dando lugar al pronúcleo masculino (PNM). Al mismo tiempo el ovocito finaliza la meiosis II, se libera el segundo corpúsculo polar, el genoma materno también se descondensa, se forma la membrana nuclear y queda constituido el pronúcleo femenino (PNF) (Sun y Nagai, 2003).

Luego de la formación de los PNM y PNF estos migran gradualmente hacia el centro del ovocito donde se aproximan el uno con el otro. Durante este trayecto replican su ADN, se desintegran sus membranas nucleares y sus cromosomas se asocian preparándose para la primera división mitótica (Elder y Dale, 2011).

La fusión de los pronúcleos masculino y femenino se considera el fin del proceso de fecundación y el inicio del desarrollo embrionario. En los mamíferos este proceso dura aproximadamente 12 h (Martínez, 2002). Posteriormente, se forma

el primer surco de segmentación, seguido de una serie de divisiones mitóticas que culminarán con la formación del blastocisto.

El primer clivaje separa al cigoto en 2 blastómeros iguales o casi iguales e independientemente de las especies, se realiza entre las 11 h y 20 h posfecundación. Estas células luego se dividen secuencialmente de forma paralela (meridional) u ortogonal (ecuatorial) al plano de clivaje inicial para generar un embrión de 4 blastómeros. Este desarrollo asincrónico de los estadios más tempranos es propio de los mamíferos. Por lo tanto, estos embriones no multiplican sus células exponencialmente desde los estadios de 2 a 4 y de 4 a 8 células, sino que es posible ver en ellos, números impares de blastómeros (Li *et al.*, 2010).

A partir del estadio de 80 a 100 células en bovino, los blastómeros periféricos comienzan a liberar sodio hacia el interior del embrión lo que arrastra agua para mantener la isotonicidad dando lugar a la formación del blastocele y por lo tanto al estadio embrionario de blastocisto. Rodeando la nueva cavidad se encuentra una capa de células planas llamada trofoblasto. En uno de los polos (polo embrionario) y haciendo protrusión en la cavidad blastocélica se produce una acumulación de células que se denomina MCI y que dará origen al embrión con todos los órganos del nuevo individuo, mientras que el trofoblasto formará parte de la futura placenta uterina (Figura N° 06).

Las células del trofoblasto secretan estripsina (una proteasa parecida a la tripsina) que produce una ruptura de la matriz fibrilar de la ZP permitiendo que el blastocisto se libere (eclosione) y se implante en la pared (Eynard *et al.*, 2008).

### **3.2.9. Viabilidad de embriones**

La viabilidad de los embriones producidos a partir de ovocitos obtenidos por aspiración folicular de animales después de su sacrificio es similar a la alcanzada por embriones producidos por otros procedimientos *in vitro*, pero más baja que la obtenida por lavado uterino, obteniéndose porcentajes de preñez que varían desde un 25 hasta un 45% (Kruip *et al.*, 1994).

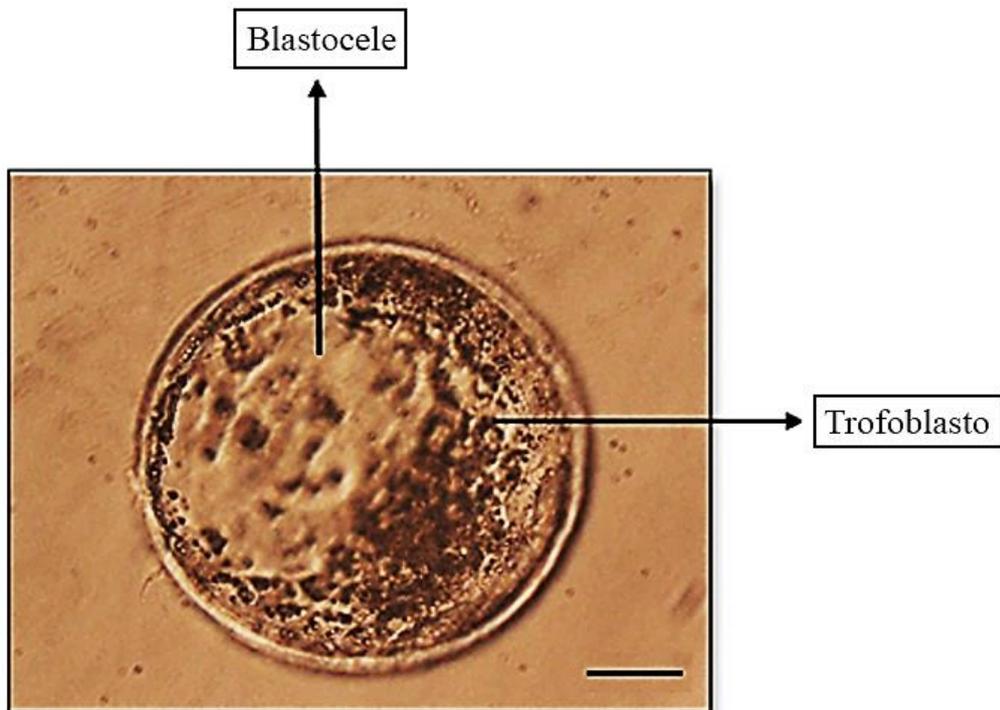


Figura N° 06 Blastocito expandido

La figura muestra un embrión en estadio de blastocisto expandido, con su respectiva blastocele y trofoblasto. La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Fuente: Propia.

Por lo general, el desarrollo de los embriones en CIV es más lento que *in vivo*, dando lugar a blastocistos con un menor número de células unido a una progresiva pérdida de viabilidad y a un metabolismo reducido (McKiernan y Bavister, 1994).

La viabilidad embrionaria también es afectada por la estación del año, aunque también hay mecanismos implicados en las variaciones de la fertilidad según la época del año, uno de estos podrían ser los cambios en el crecimiento folicular y, por consiguiente, en la calidad de los ovocitos (Wetterman y Bazer, 1985).

En muchas situaciones, una reducción en la competencia para el desarrollo y/o condiciones sub óptimas de cultivo se combinan para producir un retraso en los embriones, anormalidades en el desarrollo y una reducción de la viabilidad (Zhang *et al.*, 2009).

Los embriones PIVE presentan una viabilidad reducida, las tasas de preñez seguida de la transferencia son generalmente bajas, existen altas pérdidas fetales, muchas anormalidades congénitas, el fenómeno llamado síndrome del becerro gigante, entre otros (Lonergan y Fair, 2008).

Por lo tanto, una prueba que se puede hacer para poder determinar la viabilidad de los embriones es a través de la tinción con fluorocromo diacetato de fluoresceína (FDA), esta se basa en la integridad de la membrana para indicar la viabilidad del embrión, debido a la permisividad de esta a la entrada de este fluorocromo. Los embriones se observan mediante un microscopio de fluorescencia, los vivos y con mayor actividad enzimática presentan una fluorescencia verde fosforescente, mientras que los muertos no la presentan. Esta tinción se puede combinar con la tinción con yoduro de propidio (IP) que tiñe las células de los embriones muertos con un color rojo fosforescente (Cuadrado, 2012).

Aparte de estas tinciones la prueba definitiva que va a medir la viabilidad embrionaria es el establecimiento de gestaciones y el nacimiento de crías vivas tras la transferencia a una hembra receptora.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Ubicación

El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza.

### 4.2. Material biológico

#### 4.2.1. Aspiración y selección de los COCs

Todos los medios y reactivos usados son de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Antes de la colecta de los ovarios se realizó una evaluación visual de la presencia de cuerpo luteo persistente, cuerpo hemorrágico y presencia de folículo dominante para su transporte del centro de faenado de Chachapoyas-Amazonas al laboratorio de biotecnología, en un recipiente isotérmico conteniendo solución salina al 0.9% de cloruro de sodio con 0.0625 mg/ml de estreptomina, temperado a 38 °C. En el laboratorio, los ovarios fueron lavados en solución salina al 0.9% de cloruro de sodio. Luego, se aspiraron los complejos ovocito-*cúmulus* (COCs) usando una jeringa de 10 ml y una aguja de 18 G x 1 ½, con medio PBS - PVA suplementado con 0.01mg/ml de Gentamicina. Para la búsqueda y selección de los COCs se utilizó un estereoscopio (Olympus, Japón). La clasificación de los COCs por grupo se realizó en cuatro categorías, dependiendo de la presencia y calidad de las CC, la coloración y forma del ovocito (Figura N° 07) (Senatore *et al.*, 2010).

#### 4.2.2. Aislamiento y cultivo de células del *cúmulus oophorus*

Las CC se obtuvieron al momento de la aspiración de los COCs. Esta célula fue aislada y cultivada en una placa de 60 mm, en gotas de 100 µl con el medio de cultivo que contenía SOF base modificado (Anexo; Tabla N° 04), suplementado con 1X de amino ácidos esenciales, 1X de amino ácidos no esenciales y 0.04 mg/ml de mioinositol, luego se cultivaron en una atmósfera humidificada a 38.5°C con 6% CO<sub>2</sub>, por 42 h (Cayo-Colca *et al.*, 2014).

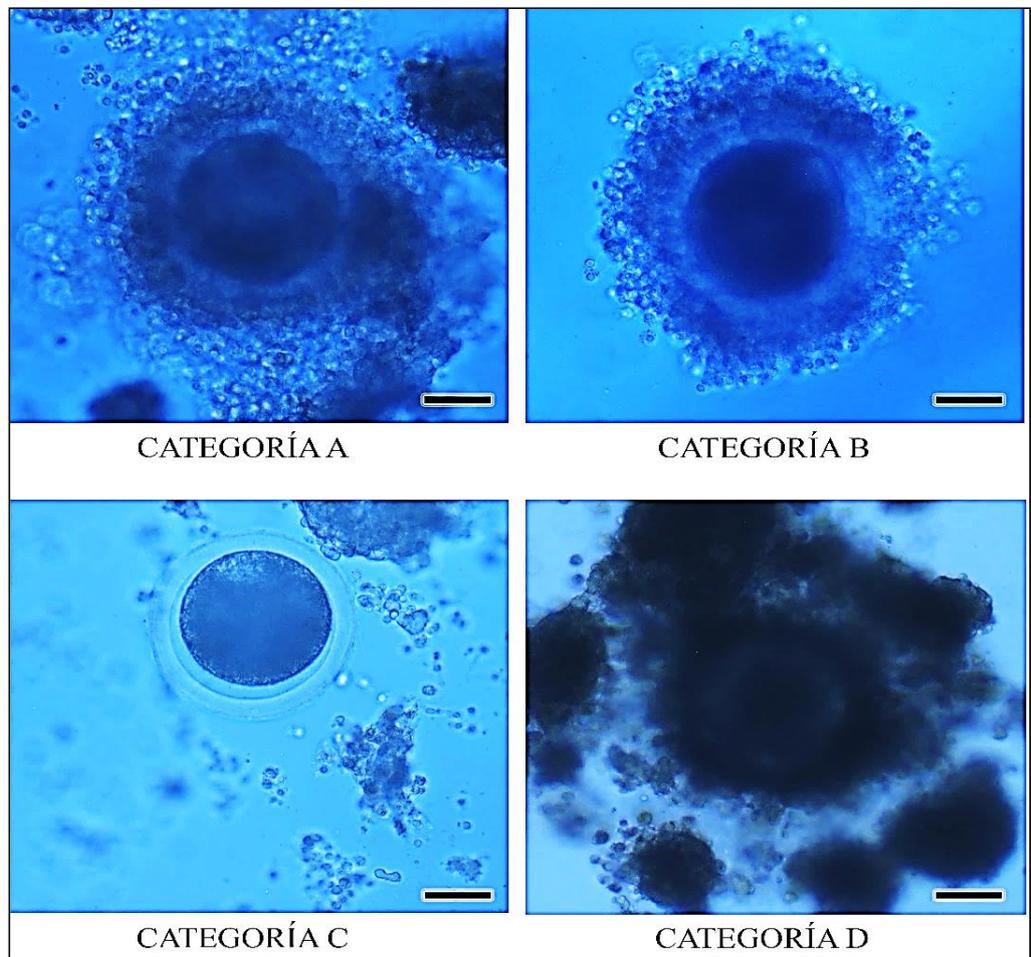


Figura N° 07 Categorización de los ovocitos

Se muestran ovocitos en diferentes categorías: ovocito con CC compacta mayor a 4 capas y con citoplasma homogéneo (A), ovocito con 1 a 3 capas de CC y citoplasma homogéneo (B), ovocito denudo y citoplasma irregular con zonas transparentes (C) y ovocito con CC expandidas y citoplasma irregular y con zonas oscuras (D). Las barras indican 50 µm.

Fuente: propia

#### 4.2.3. Maduración *In vitro* de los COCs

Los COCs de ovarios fueron usados para este experimento, siguiendo el procedimiento de aspiración y lavado descrito previamente. Los grupos de COCs fueron clasificados de forma similar a lo descrito, para posteriormente ser madurados *in vitro* separadamente por 24 h en una incubadora (ESCO, SINGAPUR) con 6% CO<sub>2</sub> a 38.5 °C, en placas de 35 mm (Nunc, USA) en medio de maduración TCM-199 (medio de cultivo de tejidos 199) suplementado con 0.5 mg/ml de piruvato de sodio, 12 µg/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF), 0.05 UI/ml de hormona folículo estimulante (FSH), 0.05 UI/ml de hormona luteinizante (LH), 0.004 UI/ml de hormona gonadotrofina menopáusica humana (HMG) y 10% suero fetal bovino (SFB).

Los ovocitos fueron clasificados como maduros (MII) por la presencia del corpúsculo polar, los cromosomas condensados y la ausencia de vesícula germinal. Se seleccionó el 10% de ovocitos maduros para evaluar la estructura nuclear con un microscopio binocular (Olympus, Japón) previa fijación con ácido acético-etanol (1:3, vol/vol). Luego de 72 h como mínimo fueron teñidos con 1% de acetorceína (wt/vol) (Figura N° 08) (Motlik y Fulka, 1976).

Otro grupo de ovocitos continuó el experimento de fecundación *in vitro* post maduración.

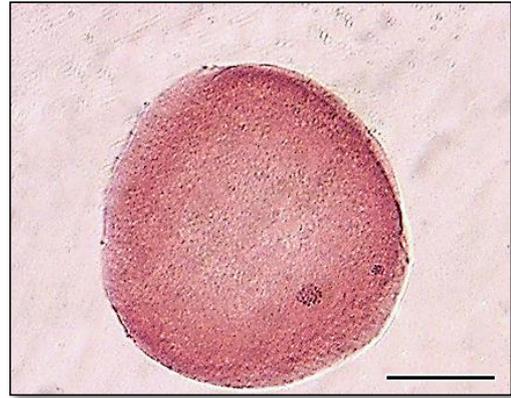
#### 4.2.4. Fecundación *In vitro* de los COCs

Para este experimento se utilizó semen congelado de toros de la raza Angus, de la UNTRM-A.

A las 24 h de realizada el experimento de maduración *in vitro* se procedió a seleccionar espermias móviles por el método de gradiente de Percoll (Parrish *et al.*, 1995), con la ayuda de una centrifuga (BOECO, Alemania) y los espermias seleccionados se capacitaron en el medio de fecundación *in vitro* suplementado con 0,24 µg/ml de heparina. Los COCs madurados (Figura N° 09) y los espermatozoides capacitados se incubaron por 18 h en una atmósfera humidificada a 38.5 °C con 6% CO<sub>2</sub> en gotas de 75 µl en placas de 35 mm (Figura N° 10).



A



B

Figura N° 08 Vesícula germinal y metafase II

La fotografía A muestra un ovocito en estadio de VG y la fotografía B muestra un ovocito en estadio de MII. La barra indica 50  $\mu$ m.

Fuente: propia.

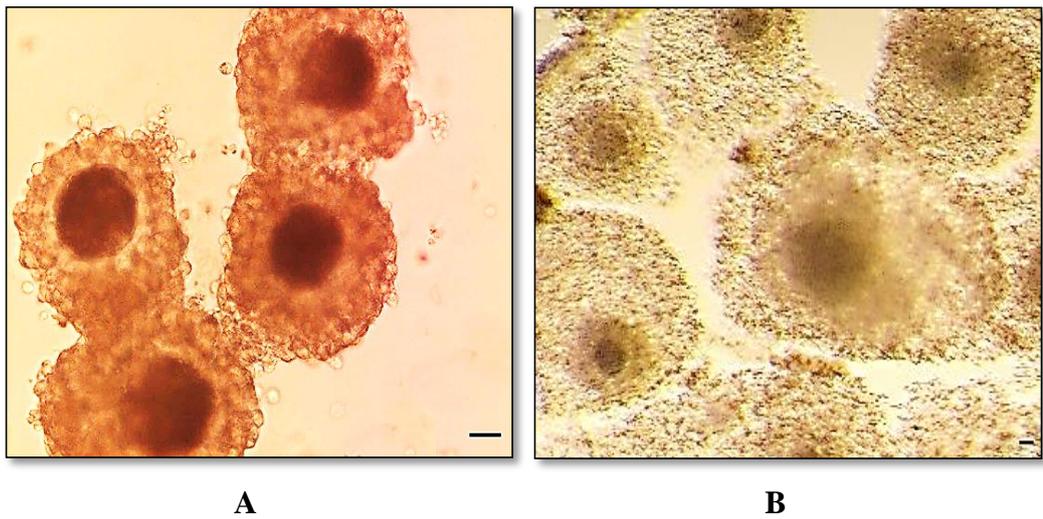


Figura N° 09 Expansión de las células del *cúmulus oophorus*

La fotografía A muestra los COCs al momento de su ingreso para la MIV con las CC compactas y la fotografía B muestra los COCs posterior a 24 h de MIV con las CC expandidas. Los ovocitos fueron obtenidos de de folículos de 2-6 mm de diametro. La barra indica 50  $\mu$ m.

Fuente: propia.

#### **4.2.5. Cultivo *in vitro***

Pasados las 18 h de FIV, se procedió a denudar y lavar a los presuntos cigotos en el medio SOF base (Anexo; Tabla N° 04) suplementado con 1X de amino ácidos esenciales, 1X de amino ácidos no esenciales y 0.04 mg/ml de myoinositol. Los cigotos fueron cultivados con el sistema de cocultivo (con CC) en grupos de 25, dentro de gotas de 100 µl, en placas de 60 mm (Figura N° 10).

El grupo control (sin CC) se cultivó en grupos de 25, dentro de gotas de 75 µl, en placas de 35 mm, utilizando el mismo medio de cultivo, a la misma temperatura y por el mismo tiempo (Figura N° 11). Solo los que se confirmaron como cigotos o dos células, fueron usados para esta prueba, los demás fueron descartados.

#### **4.2.6. Determinación de la viabilidad de embriones**

La calidad de los embriones producidos se relacionó directamente con su viabilidad y fue medida a través de la tinción con los fluorocromos propidium iodide (PI) y fluorescein diacetate (FDA); ya que estos indican el daño al ADN y la actividad enzimática, respectivamente. Para ello, los embriones en estadio de mórula y blastocisto se denudaron totalmente con una micropipeta de 200 µl en medio de manipulación que contenía PBS-PVA suplementado con 0.025 mg/ml de estreptomicina. Luego, fueron colocados en medio de tinción compuesto por PBS-PVA suplementado con 0.1 mg/ml de PI y 0.0015 mg/ml de FDA y llevados a incubación por 10 min; luego del cual, se examinaron con ayuda de un microscopio invertido (Olympus, Japón) con fluorescencia. La intensidad promedio de la coloración se midió con el programa Adobe Photoshop CC 2014 (Figura N° 12).

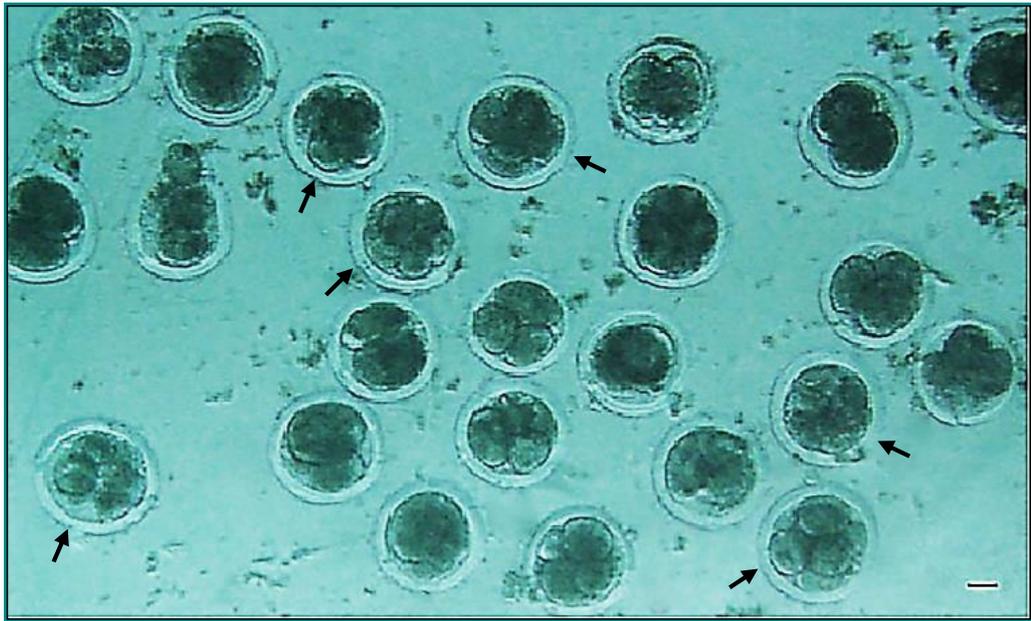


Figura N° 10 Divisiones embrionarias

Posterior a la fecundación, entre 24 a 36 h, se puede apreciar el tercer ciclaje. La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Fuente: propia.

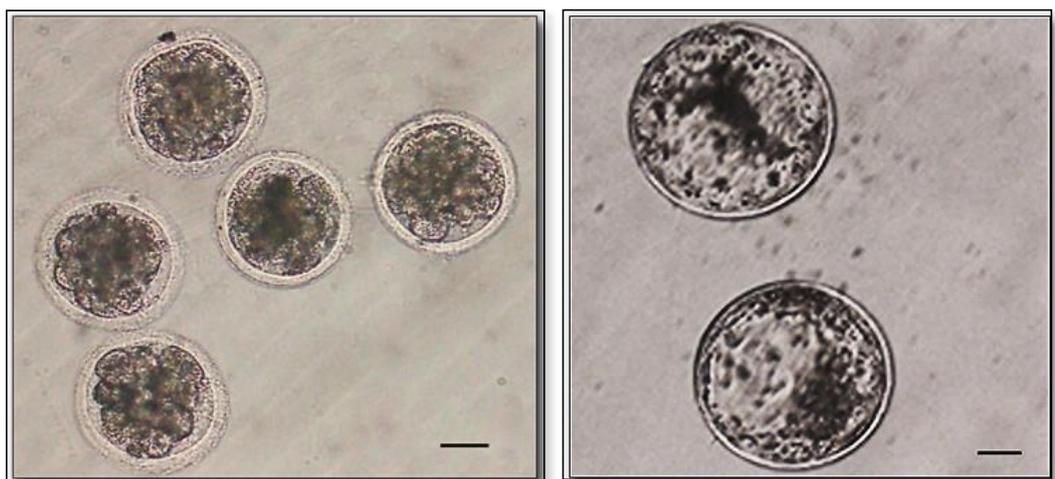


Figura N° 11 Mórulas y blastocistos

Entre el quinto y sexto día post fecundación se observaron mórulas compactas y blastocistos. Las fotografías muestran embriones a partir de ovocitos obtenidos de folículos de 2 a 6 mm. La barra indica 50  $\mu$ m.

Fuente: propia.

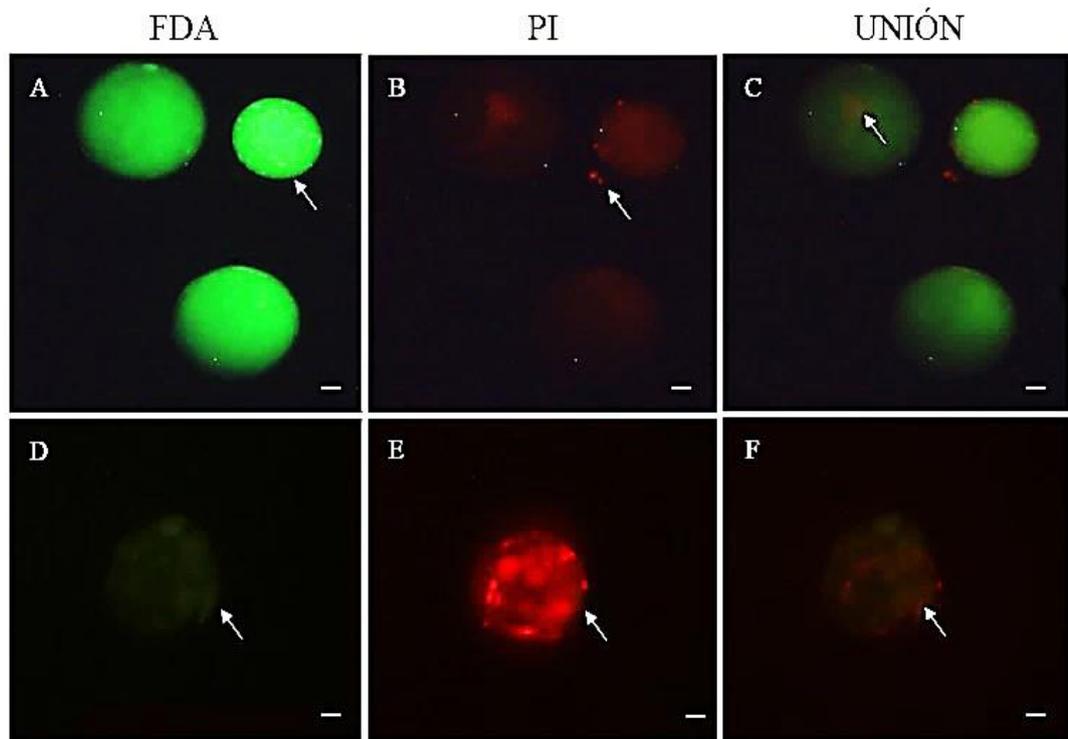


Figura N° 12 Análisis de viabilidad y actividad enzimática

Posterior a 7 días de cultivo se puede apreciar; A: blastocisto viable; la tinción verde indica actividad enzimática-viabilidad. B: blastocisto con trazas de muerte celular, probablemente de células del *cúmulus*. D: blastocisto no viable; la tinción verde oscuro indica daño, y un bajo índice de actividad enzimática. E: blastocisto con muerte celular, los puntos rojos fosforescentes indican daño en el ADN. La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Fuente: propia.

### **4.3. Análisis de datos**

Para determinar la existencia o no de diferencia entre los porcentajes de embriones y la calidad de los mismos, obtenidos con cocultivo y sin el se utilizó la prueba de homogeneidad de varianza (ANOVA) y la prueba T-student al 5% para muestras independientes con varianza poblacional desconocida. La muestra por cada repetición fue menor a 30. La prueba se realizó con el programa estadistix 8.0.

## V. RESULTADOS

La Tabla N° 01 muestra ovocitos de las categorías A y B teñidos con acetorceina. Se observa que el 86.7% de los ovocitos examinados se encuentran en el estadio de vesícula germinal. Este porcentaje nos permitió demostrar que la selección y clasificación de ovocitos se realizó adecuadamente. Por lo tanto, los ovocitos pueden ser considerados aptos para la MIV. También se observó que el 13.3% de los ovocitos examinados ya estaban degenerados al momento de la aspiración a pesar de la clasificación. Esto significa que los ovocitos pueden tener una apariencia externa que no necesariamente va acorde a las características internas.

En la Tabla N° 02 se observa que del total de ovocitos examinados y sometidos a MIV, el 75% alcanzó la metafase de la segunda división meiótica luego de 24 h del inicio de la MIV. Se puede apreciar también que el 15% de los ovocitos examinados no llegaron a madurar por que se degeneraron durante el proceso. Sin embargo, cabe considerar que un porcentaje ya ingresó como degenerado al inicio de la MIV. Además, se puede apreciar que la totalidad de los ovocitos presentaron expansión de las CC al final de la MIV. Sin embargo, tan solo aquellos que alcanzaron a culminar el periodo de maduración presentaron la extrucción del primer corpúsculo polar (Figura N° 08, fotografía B).

La Tabla N° 03 muestra la prueba de viabilidad con FDA, encontrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a favor del sistema con cocultivo, encontrándose mayor actividad enzimática en él. La prueba con PI señala que el sistema con cocultivo tuvo menor daño a nivel del ADN (Figura N° 12). Con respecto a la cantidad no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ambos tratamientos, pero si se puede apreciar que el sistema sin cocultivo aparenta tener un proceso de desarrollo más acelerado que el sistema con cocultivo.

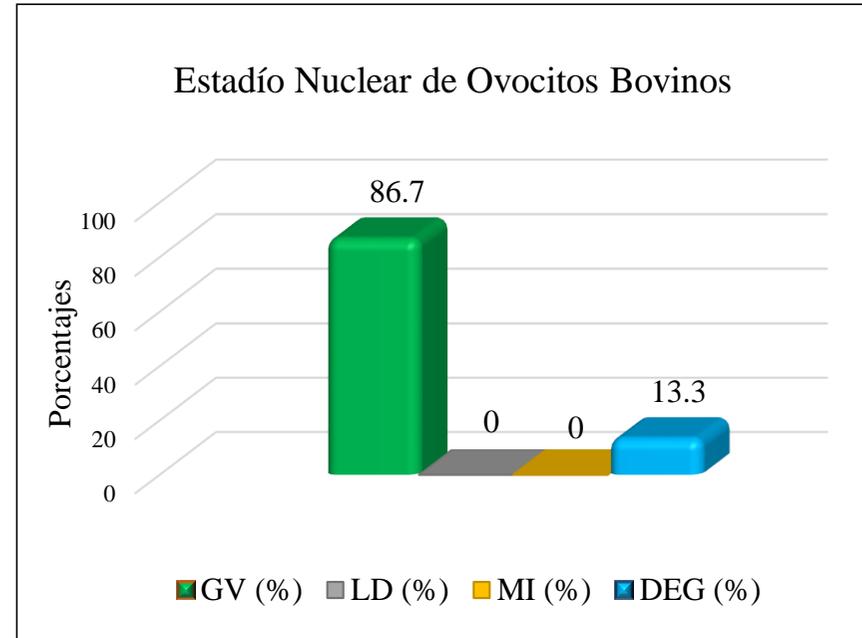
La Tabla N° 04 A y B muestran los embriones viables y el estadio embrionario alcanzado al séptimo día de CIV. Se puede apreciar que tanto los cigotos cultivados con el sistema de cocultivo así como sin él, lograron llegar hasta el estadio de mórula, blastocisto inicial, blastocisto y blastocisto expandido (25.7%-20.4%, 20.6%-22%, 5%-7.3%, 2.1%-1.4%; respectivamente). De igual modo el porcentaje de embriones degenerados fue de 46.6% y 48.9%, respectivamente.

**Tabla N° 01** Estadío nuclear de ovocitos bovinos de folículos antrales

Diámetro del folículo (mm)	No. Ovocitos examinados	% Estadío Nuclear				
		total GV	GV (%)	LD (%)	MI (%)	DEG (%)
2 - 6 mm	30	26	26 (86.7)	0 (0)	0 (0)	4 (13.3)

\*Los COCs, coleccionados de folículos antrales con diámetro de 2 a 6 mm fueron seleccionados dentro de las categorías de A y B, se procedió a denudarlos, fijarlos con ácido acético-etanol (1:3, vol/vol) y teñirlos con 1% de acetorceina. Posteriormente se observaron a 4X de aumento en un microscopio binocular (Olympus-Japón). El total de ovocitos representan dos repeticiones.

\*\* VG: vesícula germinal; LD: Diaquinesis; MI: metafase I; y DEG: degenerados.

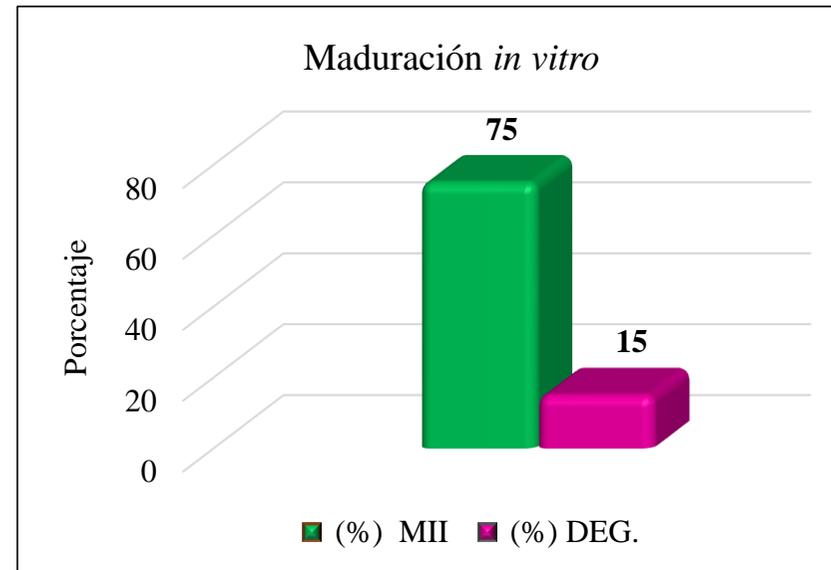
**Figura N° 13** Comparación entre estadío nuclear y porcentajes obtenidos

**Tabla N° 02** Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos

Diámetro del folículo (mm)	No. Ovocitos examinados	Tiempo de MIV (h)	No. (%) ovocitos en MII	No. (%) ovocitos deg.
2 - 6 mm	80	24	60 (75)	20 (15)

\*El COCs, coleccionados de folículos antrales con diámetro de 2 a 6 mm **fuero**n cultivados por 24h en un medio de maduración (TCM-199), se procedio a denudarlos, fijarlos con con ácido acético-etanol (1:3, vol/vol) y a realizar una tinción con 1% de acetorceina posteriormente se observaron en un microscopio binocular (Olympus-Japón). El total de ovocitos representan dos repeticiones.

\*\*MII: Metafase II. DEG: degenerados



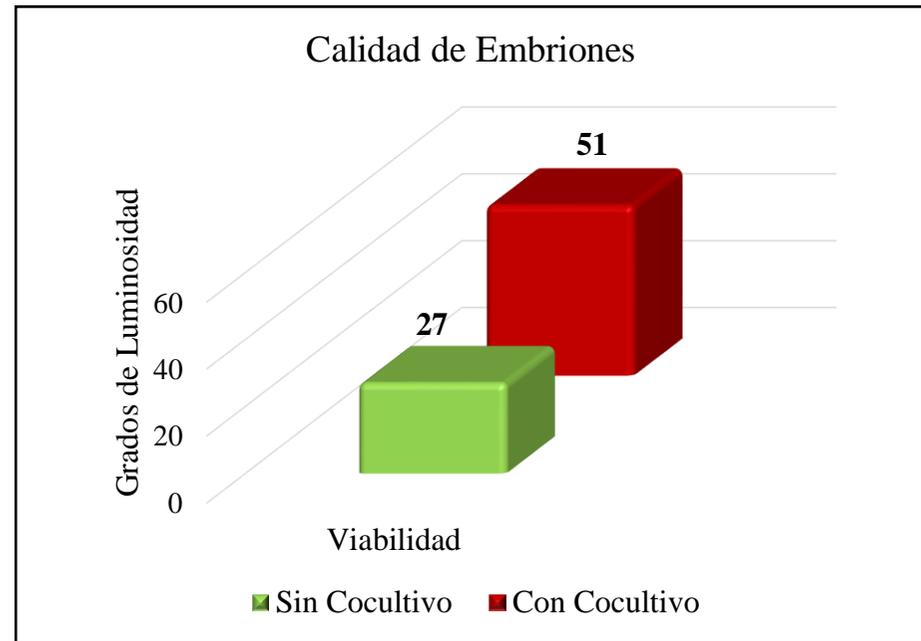
**Figura N° 14** Relación entre el porcentaje de maduración y degenerados

**Tabla N° 03** Calidad de embriones en función a su viabilidad

Sist.	Viabilidad*	
	$\bar{X}$	S
CCIV	51 <sup>a</sup>	± 58
CIV	27 <sup>b</sup>	± 26

\*La calidad de los blastocistos se midió con la tinción de fluorocromos (FDA y PI);  $\bar{X}$  representa promedio de grados de luminosidad.

<sup>a-b</sup>: letras diferentes en superíndice muestra diferencia estadística ( $p < 0.05$ ).

**Figura N° 15** Calidad de embriones según su viabilidad (actividad enzimática)

**Tabla N° 04** Porcentaje total de embriones viables

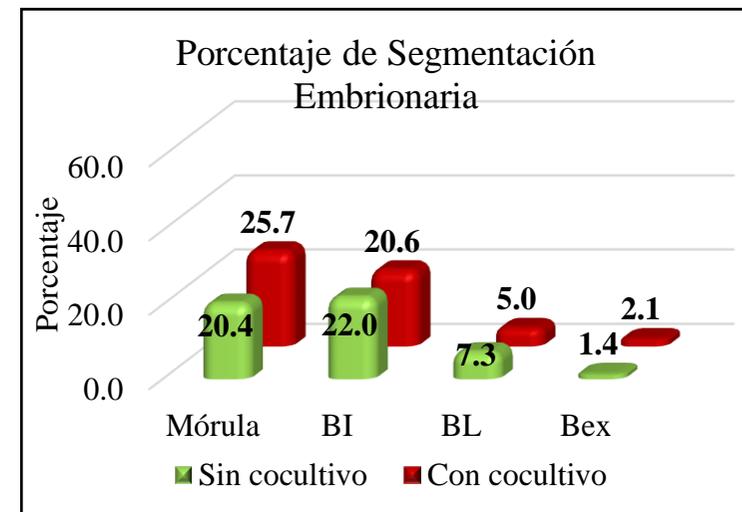
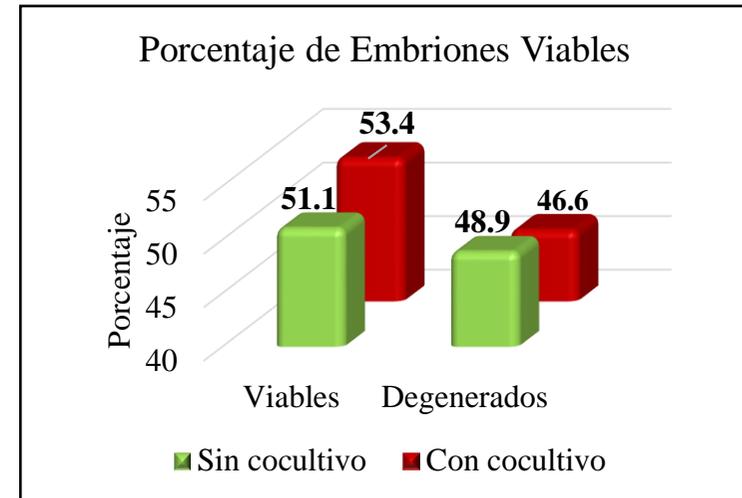
Sist.	Viables	Degenerados
CCIV	53.4	46.6
CIV	51.1	48.9

**Tabla N° 05** Desarrollo *in vitro* de embriones bovinos

Sist.	N°. Cigotos*	N°. (%) Segmentación embrionaria**				
		M	BI	BL	Bex	Deg.
CCIV	155	39 (25.7)	32 (20.6)	8 (5.0)	3 (2.1)	73 (46.6)
CIV	155	31 (20.4)	34 (22.0)	11 (7.3)	2 (1.4)	77 (48.9)

\* Los cigotos, fueron seleccionados al momento del cultivo, se observó la extrusión de los pronúcleos masculino y femenino y la primera división (dos células), los mismos que fueron distribuidos al sistema de cocultivo (CCIV) y sin él (CIV).

\*\*M: Morula; BI: Blastocisto inicial; BL: blastocisto propiamente dicho; Bex: blastocisto expandido; Deg: degenerados.

**Figura N° 16** Porcentaje total de embriones viables**Figura N° 17** Porcentaje de segmentación embrionaria durante el CIV

## VI. DISCUSIÓN

La PIVE, en el bovino, es motivo de muchas investigaciones, debido a las bajas tasas de blastocitos obtenidos (5-30%), consecuencia del constante “bloqueo del desarrollo” por la manipulación del óvulo o del embrión. Con la finalidad de evitar este bloqueo se han empleado cocultivos con células somáticas, obteniendo resultados controversiales (Martínez, 2014). Por ello, este experimento usó a las CC, para determinar la calidad en función a su viabilidad y su efecto en la PIVE.

Con relación a la calidad en función a la viabilidad de los embriones producidos en este experimento, no se puede concluir aún que esta haya mejorado. Sin embargo, se observó que hay una mayor actividad enzimática y menor daño al ADN en los embriones que estuvieron bajo el sistema de cocultivo comparados al grupo control. Esta actividad enzimática es efecto del uso del cocultivo, que podría estar sincronizando la división nuclear y citoplasmática y la prevención del endurecimiento de la ZP que facilitaría la eclosión del blastocisto (Dey *et al.*, 2012).

Van den Hurk y Zhao (2005), señala que las CC son fundamentales para el desarrollo embrionario, este debe estar unido por uniones Gap al citoplasma del ovocito durante la maduración ya que a través de estas, se transportan nutrientes, precursores metabólicos y hormonas fundamentales para la maduración del ovocito. En nuestro experimento se observó que el cocultivo con células del *cúmulus oophorus* podrían estar retardando el desarrollo embrionario, y esto a su vez podría influir en la sincronización de los eventos durante el ciclo celular, mejorando de este modo, la calidad de los embriones producidos (Senatore *et al.*, 2010).

Staigmiller y Moor (1984), Kamishita *et al.* (1999), observaron que cocultivos con CC y células epiteliales; respectivamente, aumentaron la capacidad de desarrollo del embrión. Las CC parecen tener también propiedades embriotróficas según ha sido indicado por Vansteenbrugge *et al.* (1994), ya que producen sustancias que incrementan el desarrollo de los embriones bovinos. Contrario a ello, en este experimento, se observó que el uso de CC (cocultivo) no tuvo efecto alguno sobre las tasas de PIVE de los embriones al séptimo día. Esto puede deberse a que los protocolos así como, la fuente de células somáticas y los

animales usados por ellos fueron diferentes a los nuestros (Staigmiller y Moor, 1984; Kamashita, 1999).

Goovaerts *et al.* (2009), obtuvieron 6,3% de blastocito con un sistema de cocultivos con CC en un ambiente con mezcla de gases. Estos resultados son relativamente más bajos a los obtenidos en esta investigación. Sin embargo, cabe considerar que en esta investigación solo se usó CO<sub>2</sub>, durante todo el proceso, el sistema de cultivo (gotas) fue también diferente, los medios y días de cultivo también variaron.

Senatore *et al.* (2010), determinaron que la selección y clasificación de ovocitos se debería realizar en cuatro categorías (A, B, C, D), los de categoría A y B poseen mayor capacidad de maduración y por ende mayor capacidad de fecundación, estos pueden llegar a producir blastocistos; mientras que los de categoría C y D no tienen la capacidad de maduración, por lo tanto, detienen su desarrollo; en esta investigación se utilizaron ovocitos de categoría A y B para determinar el porcentaje de ovocitos aptos para entrar a la MIV, obteniendo un 86,7% de ovocitos en estadio de VG (apto) y un 13.3% de ovocitos en estado de degeneración. Sumado a ello, se pudo observar un 13.3% de degenerados al momento de la aspiración. Esto demuestra que los ovocitos pueden tener una apariencia externa de excelente a buena que no necesariamente va acorde a las características internas (citoplasmáticas y nucleares) del ovocito.

A pesar de la selección y clasificación de los ovocitos y considerando que el 13.3% ingresaron en estado de degeneración a la MIV, se logró obtener un 75% de ovocitos que alcanzaron la metafase de la segunda división meiótica, luego de 24 h de MIV, estos resultados están por encima de los 61.36% encontrados por Francisco *et al.* (2008) y por debajo de los 90% encontrados por Martínez, (2014), esto podría deberse a la diferencia en el tamaño del folículo del cual fueron obtenidos los ovocitos, a los protocolos utilizados, el método de manejo y a la condición de los animales utilizados por ellos, ya que estos fueron diferentes a los nuestros.

## VII. CONCLUSIONES

- El uso de cocultivos permitió obtener embriones de apariencia viable, en comparación con el tratamiento (sin cocultivo), debido a que se obtuvo un menor número de células muertas (evaluadas con PI); no obstante, el sistema con cocultivo no incrementó la tasa de producción *in vitro* de embriones.
- Según la literatura, la maduración *in vitro* de ovocitos esta influenciada por el tamaño de los folículos y la calidad de los ovocitos contenidos en ellos. Además, la calidad del ovocito esta determinada por el número de CC, la morfología y el color. Sin embargo, se observó que no es una determinante ya que también hay un grupo que puede estar en proceso de degeneración.
- Los porcentajes obtenidos en el grupo control (sin cocultivo), 20.4% de mórulas y 30.7% de blastocistos (desde inicial hasta expandido), a diferencia del tratamiento (con cocultivo), en el cual se obtuvo 25.7% de mórulas y 27.7% de blastocistos dan indicios de que hay un desarrollo ligeramente más acelerado en los sistemas sin cocultivo.
- El sistema de cocultivo con células del *cúmulus* no incrementó, las tasas de PIVE. En este experimento no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos ( $p>0.05$ ).
- El tratamiento (con cocultivo) mejora la actividad enzimática de los embriones a diferencia del grupo control (sin cocultivo), comprobado mediante la intensidad de fluorescencia a través de la tinción con fluorocromos (FDA); lo que se vió reflejado en la viabilidad de los mismos.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Utilizar células del *cúmulus oophorus* en cocultivos, ya que esto permite obtener embriones viables.
- Continuar esta investigación, transfiriendo los embriones procedentes de cocultivo con CC, con la finalidad de validar el protocolo.
- Elaborar un sistema de clasificación de embriones FIV en función a la viabilidad y al nacimiento de terneros para demostrar la calidad de los embriones obtenidos.
- Realizar una preclasificación de los ovarios antes de seleccionar los folículos a ser aspirados. Se recomienda que la preclasificación esté en función al cuerpo luteo persistente, cuerpo hemorrágico y presencia del folículo dominante.
- Continuar con la clasificación de ovocitos recomendado por Senatore *et al.* (2010) el mismo que está en función al número de capas de las células del *cúmulus oophorus* y la coloración del citoplasma.
- Probar diferentes sistemas de cocultivos existentes en la actualidad para identificar aquellos que mejoren las tasas de PIVE y el nacimiento de terneros.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Ahuja, C., Montiel, F., Pérez, P. y Gallegos, J. (2009). Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootec Trop*, 27, 277-284.
- Aller, J., Alberio, R. y Palma, G. (2015). Gestación con embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. *Revistas electrónicas UACH*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
- Amleh, A. y Dean, J. (2002). Mouse genetics provides insight into folliculogenesis, fertilization and early embryonic development. *Hum Reprod Update*, 8, 395-403.
- Amstrong, D. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55, 1303-1322.
- Azambuja, R.M., Kraemer, D.C., Westhusing, M.E. (1998). Effect of low temperatures on *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 49, 1155-1164.
- Bavister, B. D. (1987). *Studies on the developmental blocks in cultured hámster embryos*. En *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation in vitro* (pp. 219-249). Plenum Press.
- Bedford, J.M. (2008). Puzzles of mammalian fertilization – and beyond. *Int. J. Dev. Biol*, 52, 415-426.
- Bedford, J.M. y Cooper, G.W. (1978). Membrane fusión events in fertilization of vertebrate eggs. En *G. Nicolson GL (Eds.) Membrane Surface Reviews (Membrane Fusion)* (pp. 65-125). North-Holland: Amsterdam.
- Boiso, I., Veiga, A. y Edwards, R. (2003). *Fundamentos del crecimiento embrionario humano in vitro y de la selección de embriones de alta calidad para transferencia*. En: Ewards, R y Riquez, F. reproducción asistida moderna, (ares trading Uruguay S. A) Montevideo; Uruguay, 65-440.
- Bousquet, D., Twagiramungu, H., Morin, N., Brisson, C., Carboneau, G. y Durocher, J. (1999). *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 51, 59-70.
- Brackett, B. G. (1981). Applications of *in vitro* fertilization. En *New Technologies in Animal Breeding*. *Academic Press*. 141-159.
- Canipari, R. (1994). Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote*, 2, 343-345.

- Cardona, M. D., Olivera, A.M. y Cadavid, A.P. (2006). Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Arch. Esp. Urol*, 59 (5), 501-510.
- Cayo-Colca, I. S., Naoko, K. y Takashi, M. (2014). Effect of estradiol-17 $\beta$  during *in vitro* growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles International Embryo Transfer Society, Manual, IETS. (2010). Pg. 67-70.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.Y. y Su, Y.Q. (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol*, 20, 715-723.
- Cordova, A., C. Perreau, S. Uzbekova, C. Ponsart, Y. Locatelli, P. Mermillo. (2014). Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*, 81(9), 1163–1173.
- Cuadrado, F. S. (2012). *Evaluación de ovocitos ovinos por microscopia de luz polarizada* (Trabajo fin de master). Recuperado de <http://digibuo.iniovi.es/dspace/bitstream/10651/4014/1/TFMdef.pdf>
- De los Reyes, M., Luna, D. y Palomino, J. (2010). Meiotic development and cortical granules distribution in canine oocytes during *in vitro* maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 324-325.
- De los Reyes, M., Palomino, J. y Pamela, S. (2011). Mitochondrial distribution and meiotic development in canine oocytes during *in vivo* and *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 75, 346-353.
- De Mattos, D. G., Gasparríni, B., Fumus, C.C. y Thompson, J.G. (1999). Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of ovine oocyte: Effect of Cysteamine and BMercatothano. *Theriogenology*, 5(1), 368.
- Del Campo, M. (1993). Fertilización *in vitro*. *Instituto de Reproducción Animal Córdoba-Argentina*, 1, 1-20.
- Dey, S., Deb, G., Ha, A., Lee, J., Bang, J., Lee, K. y Kong, I. (2012). Coculturing denuded oocytes during the *in vitro* maturation of bovine cumulus oocytes complexes exerts a synergistic effect on embryo development. *Theriogenology*, 77, 1064-1077.
- Eddy, E.M. (2006). En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. Neill JD (Eds). Elsevier/Academic Press, (pp. 3-54.), Amsterdam: Boston.

- Elder, K. y Dale, B. (2011). Sperm-oocyte interaction. En *In vitro* fertilization. (3 ed.) Cambridge University Press, UK.
- Ellington, J. E., Carney, E. W., Farrell, P.B., Smkin, M. E. y Foote, R. H. (1990). Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.*, 43, 97-104.
- Eppig, J. J. (1979). Gonadotropin stimulation of the expansión of cúmulus oophori isolated from mice: general conditions for expansión *in vitro*. *J exp zool*, 208, 111-120.
- Eynard, A.R., Valentich, M.A. y Rovasio, R.A. (2008). Componentes celulares y moleculares involucrados en etapas tempranas del desarrollo. En *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares* (pp. 140-168). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Famishita, H., Takagi, M., Choi, Y., Wijayagurawardane, M., Miyazawa, K. y Sato, K. (1999). Developmental of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos cocultured wath bovine oviductal epitelial cells obtained from oviducts ipsitateral to cystis follicles. *Animal Reproduction Science*, 56, 201-209.
- Fernández, F., Hernández, J. y Reyes, M. (2010). Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de salud animal*. 32(2), 21-23.
- Ferré, L. y Cattaneo, L. (2013). Biotecnologías reproductivas: producción *in vitro* de embriones y semen sexado. *Rev. Med. Vet*, 94(2), 28-36.
- First, N. L., Parrish, J. J. (1987). *In vitro* fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil*, 34, 151-165.
- Florman, H.M. y Ducibella, T. (2006). En *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. Neill JD (Eds) Elsevier/Academic Press (pp 55-112). Amsterdam: Boston.
- Francisco, J. B. C., Ludwing, H. y Patricia, C. V. M. (2008). Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. *Revista científica FCV LUZ*, 18(3), 253-261.
- Gardner, D. y Lane, M. (2014). *Culture of viable mammalian embryos in vitro*. *Principles of Cloning*. Second Edition. 63-84 Pp.
- Ge, L., Sui, H. S., Lan, G. C., Liu, N., Wang, J. Z. y Tan J. H. (2008). Coculture with cúmulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cúmulus oophorus: observation of nuclear and cytoplasmatic events. *Fertility and Sterility*, 6, 2376-2388.
- Gliedt, D. W., Rosenkrans, C. F. JR., Rorie, R. W., Munyon, A. L., Pierson, J. N., Miller, G. F. y Rakes, J. M. (1996). Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones

- during maturation on bovine embryo development *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 79(4), 536-542.
- González, N. y Gil, L. (2004). Producción de embriones bovinos: Revisión de las últimas tendencias. *Prod Anim.* 19 (198), 22-47.
- Goovaerts, J., Leroy, J., Rizos, D., Bermejo, P., Gutierrez, A., Jorssen, E. y Bols, P. (2011). Single *in vitro* bovine embryo production: cocultue with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Theriogenology*, 76, 1293-1303.
- Goovaert, J., Leroy, J., Van Soom, A., De Cleercq, J., Andries, S. y Bols, P. (2009). Effect of cumulus cell cocultured on oxygen tension on the *in vitro* developmental competence of bovine zygotes cultured single. *Theriogenology*, 71(5), 729-738.
- Gordon, I. (2003). Maturing the Bovine oocyte. En I. Gordon (Ed) *Laboratory production of cattle embryos: Biotechnology in agriculture* (Pp 112 – 157). Wallingford: CAB International.
- Guimarães, A., Leivas, F., Santos, F., Schwengber, E., Giotto, A., Machado, C., Goncalves., Folchini, N. y Brum, D. (2014). Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim Reprod Sci.* 146, 103–110.
- Guzmán, L., Pérez, S., Valdivia, M. (2007). Induction of the acrosomal reaction in mouse spermatozoa by the solution of pellucid zone from alpaca (*Lama pacos* L.). *Rev. Perú. Biol*, 13(3), 227-229.
- Herrera, A. M. (2012). *Co cultivo con células del cúmulus, maduración ovocitaria y calidad embrionaria* (trabajo de grado). Recuperado de <http://159.90.80.55/tesis/000156557.pdf>
- Hirayama, H., Moriyasu, S., Kageyama, S., Sawai, K., Takahashi, H., Geshi, M., Fujii, T., Koyama, T., Koyama, K., Miyamoto, A., Matsui, M. y Minamihashi, A. (2014). Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 81, 1108-1115.
- Hirokyu, S., Byeong-Seon, J. y Xiangzhong, Y. (2000). Dynamic changes of cumulus-oocytes cell communication during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 63, 723-729.
- Hyttel, P., Greve., T. y Callesen, H. (1989). Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fert., Suppl*, 38, 35-47.

- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., Chiba, K. y Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during *in vitro* fertilization. *Proc Natl Acad Sci*, 108 (12), 4892-4896.
- Johnson, J. E., Higdon, L. y Boone, W. R. (2008). Effect of human granulosa cell co-culturing using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes. *Fértil Steril*, 90(5), 1674-1679.
- Kamishita, H., Takagi, M., Choi, Y. H., Wijayagunawardane, M. P. B., Miyazawa, K. y Sato, K. (1999). Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos cocultured with bovine oviductal epithelial cells obtained from oviducts ipsilateral to cystic follicles. *Animal Reproduction Science*, 56, 201–209.
- Kopera, I.A., Bilinska, B., Cheng, C.Y., Mruk, D.D. (2010). Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 365, 1593-1605.
- Kruip, T. A., Boni, R., Wurt, Y. A., Roelofsen, M. W. y Pieterse, M. C. (1994). Potencial use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 42, 675-684.
- Lee, E. S., Fujii, Y. y Fukui, Y. (1996). A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1- and 2(3)-cell bovine embryos after *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 45(6), 1151-1162.
- Li, L., Zheng, P. y Dean, J. (2010). Maternal control of early mouse development. *Development*, 137, 859-870.
- Lin, Y., Hwang, J., Seow, K. Huang, L., Chen, H. y Tzeng, C. (2009). Effects of growth factor and cell co-culture on *in vitro* maturation of oocytes. *Reprod BioMedicine Online*, 19 (2), 165-170.
- Liu, S., Li, Y., Feng, H.L., Yan, J.H., Li, M., Ma, S.Y. y Chen, Z.J. (2010). Dynamic modulation of cytoskeleton during *in vitro* maturation in human oocytes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 203, 151-157.
- Lonergan, P. y Fair, T. (2008). *In vitro* produced bovine embryos – Dealing with the warts. *Theriogenology*, 9, 17-22.
- Lorenzini, E. J. (1997). Desarrollo de embriones bovinos obtenidos de ovocitos madurados *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo (tesis para optar al grado de licenciado en ciencias veterinarias). Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/1997/fvl869d/doc/fvl869d.pdf>

- Lu, K. H., Gordon, I., Gallager, M. y Mcgovern, H. (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec*, 121, 259-260.
- Marei, W., Ghafaric, F., Fouladi-Nashta, A. (2012). Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 78, 670–677.
- Martínez, B. (2002). *Estudio de la fecundación “in vitro” en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción in vitro de embriones* (tesis para optar por el grado de doctor). Recuperado de <http://biblioteca.ucm.es/tesis/vet/ucm-t26293.pdf>
- Martínez, S.Y. (2014). *Desarrollo embrionario bovino in vitro co-cultivado con células oviductales y del cúmulus oophorus* (tesis para optar el grado de maestría). Recuperado de <http://doczz.net/doc/6680494/desarrollo-embrionario-bovino-in-vitro-co>.
- Matorras, R. y Hernandez, J. (2007). Estudio y tratamiento de la pareja estéril: recomendaciones de la sociedad española de fertilidad, con la colaboración de la asociación española para el estudio de biología de la reproducción, de la asociación española de andrología y de la sociedad española de contracepción. Editoril Adalia. Madrid, España.
- Mattioli, M., Bacci, M.L., Galeati, G. y Seren, E. (1989). Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*. (31), 1201-1207.
- Mattioli, M., Lucidi, P. y Barboni, B. (1998). Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol reprod dev*, 51, 445-453.
- McKiernan, S.H. y Bavister, B.D. (1994). Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod*, 9, 2123-2129.
- Merton, J.S., Roos, A.P., Mullaart, E., Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P.L. y Dieleman, S. (2003). Factors affecting oocyto quality and quantity in comercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59, 651-674.
- Moor, R. M. (1984). Contact, signalling and cooperation between follicle cells and dictyate oocytes in mammals. En *Current Problems in Germ Cell Differentiation*. McLaren A. & C.C. Wylie, 307-326.
- Motlik, J. y Fulka, J. (1976). Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Zool*, 198(2), 155- 162.

- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F. y Alberio, R. (2006). Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. Med. Vet.*, 38, 97-104.
- Muci, A. C. (2000). *Cultivo in vitro de embriones bovinos* (Tesis de Grado). Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2000/fvm942c/doc/fvm942c.pdf>
- Mulheron, g. w., y schomberg, d. w. (1992). Effects of diethylstilbestrol on rat granulosa cell and theca/interstitial cell transforming growth factor-beta2 mrna expression *in vivo*: analysis by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Biol. Reprod.*, 46, 546-550.
- Otoi, T., Shin, T., Kraemer, D.C. y Westhusin, M.E. (2007). Role of cumulus cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.*, 42, 184–189.
- Parrish, J. J., Krogenaes, A., Susko-Parrish, J. L. (1995). Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of *in vitro* fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 44, 859-870.
- Peláez, V. (2011). *Producción in vitro de embriones bovinos*. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Phillips, B.T., Gassei, K., Orwig, K.E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 365, 1663-1678.
- Phillips, P. E. (1988). *In vitro* fertilization in cattle. College of Veterinary Medicine. Univ. Of Missouri- Columbia. 1, 1-19.
- Quian, Y., Shi, W.Q., Ding, J.T., Sha, J.H. y Fan, B.Q. (2003). Predictive value of the area of expanded cumulus mass on development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 49, 167-174.
- Raghu, H.M., Nandi, S. y Reddy, S. (2002). Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. *Reproduction fertility and development*, 14, 55-61.
- Reed, W. A., Tae-Kwang, S., Bunch, T. D. y White, K. L. (1996). Culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver (brl) cells, or brl-cell-conditioned medium. *Theriogenology*, 45, 439-449.
- Rexroad, C. E. y Powell, A. M. (1988). Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 29, 387-397.
- Richard, F. J. (2007). Regulation of meiotic maturation. *J. Anim. Sci.*, 85, 4-6.
- Romar, A. (2001). *Efecto de las células oviductales y el cúmulus oophorus sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación in vitro en la especie porcina*

(tesis doctoral). Recuperado de [https://es.scribd.com/doc/233927635 /Fecundación-in-Vitro-en-Cerdos](https://es.scribd.com/doc/233927635/Fecundación-in-Vitro-en-Cerdos)

- Schatten, H., Constantinescu, G.M. (2008). Comparative Reproductive *Biology*. Blackwell Publishing Professional (pp. 61-111), Oxford: UK.
- Schmaltz, B., Cordova, A., Dhorne, S., Hennequet, C., Uzbekova, S. Martinot, E., Doret, S., Martin, P., Mermillod, P. y Locatelli, Y. (2014). Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell geneexpression during *in vitro* co-culture. *Anim Reprod Sci*, 164, 3-4. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.022>
- Schultz, R. M. (1991). Meiotic maturation on mammalian oocytes. En wassarman PM (ed.), *elements mammalian fertilization* (pp 77-104). Boston: Estados Unidos,
- Senatore, E., Xu, J., Suárez, M., Gong, G., Lin, T., Bella, A., Moreno, J., Mannino, M., Tian, X., Presicce, G., Wu, S. y Du, F. (2010). *Improved in vitro development of OPU-derived bovine (Bos Taurus) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. Theriogenology*, 74, 1643–1651.
- Sepúlveda, S. (2008). *Fecundación y desarrollo en mamíferos*. En: Lerner, J y Urbina MT, Fertilidad y reproducción asistida, (1° ed.) Venezuela: Editorial medica panamericana.
- Shi, D. S., Avery, B., Greve, T. (1998). Effects of temperature gradients on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 50, 667-674.
- Shirazi, A., Moalemian, Z. (2007). Ovine cumulus cells estradiol-17 $\beta$  production in the presence or absence of oocyte. *Anim Reprod Sci*, 101, 125–133.
- Soto, M. Y. (2014). *Desarrollo embrionario bovino in vitro co-cultivado con células oviductales y del cumulus oophorus* (tesis de grado de doctor). Recuperado de <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=16646&docs=UAMI16646.pdf>
- Staigmiller, R. B., y Moor, R. M. (1984). Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res*, 9, 221-229.
- Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P.B. y Wolf, E. (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, 64, 904-909.

- Suarez, S.S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14 (6), 647-657.
- Sun, Q.Y. y Nagai, T. (2003). Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *J. Reprod. Dev*, 49, 347-359.
- Swanson, W. (2006). Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, 66, 49-58.
- Takahashi, Y., Hishinuma, M., Tanaka, H. y Kanagawa, H. (1996). Development of *in vitro* matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci*, 58, 897-902.
- Urrego, R., Tarazona, A., Olivera, M. y Camargo, O. (2008). Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecuarias*, 21, 398-405.
- Vafaye, M., Hyttel, P., Aabech, M. y Strobeck, L. (2014). Insulin-like growth factor 2: A modulator of anti-apoptosis related genes (HSP70, BCL2-L1) in bovine reimplantation embryos. *Theriogenology*, 1-9.
- Van den Hurk, R., Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63, 1717-1751.
- Vanhoutte, L., Nogueira, D. y De Sutter, P. (2009). Prematuration of human denuded oocytes in a three-dimensional co-culture system: effects on meiosis progression and developmental. *Human reproduction*, 24(3), 658-669.
- Vansteenbrugge, A., Van Langendonck, A., Scutenaire, C., Massip, A. y Dessy, F. (1994). *In vitro* development of bovine embryos in buffalo rat liver-or bovine oviduct conditioned médium. *Theriogenology*, 42, 931-940.
- Wani, N. (2002). *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Res*, 44, 89-95.
- Wetterman, R.P. y Bazer, F.W. (2003). Influence of environmental temperature on prolificacy of pigs. *J Reprod Fertil*, 33, 199-208.
- Yanagimachi, R. (2011). Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization? *Biol Reprod*, 85, 4-5.
- Yang, X., Kubota, C., Suzuki, H., Taneja, M., Bols, P. E. J. y Presicce, G. A. (1998). Control of oocyte maturation in cows: biological factors. *Theriogenology*, 49, 471-482.

Zarate, G. O. (2006). *Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos* (tesis propuesta para obtener el grado de magister en ciencias en ciencia animal). Recuperado de <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/9755/2/maestria%20Oscar%20Zarate%20Guevara>.

Zhang, L., Wang, S., Dai, Y. y Li, N. (2009). Aberrant gene expression in deceased transgenic cloned calves. *Anim. Reprod. Sci*, 112, 182-189.

## X. ANEXOS

### 10.1. Protocolo de producción *in vitro* de embriones

El pesado de sales y otros se realizará en una balanza analítica (Sartorius - Alemania) y su conservación dentro de una refrigeradora (Bosch - Alemania) a 4 °C y 20 °C.

#### A) Transporte de ovarios

**Tabla N° 06** Preparación de solución salina al 0.9%

LITRO		1 LITRO 10 X	
NaCl	9.5 gr	NaCl	95 gr
Agua destilada	1 litro	Agua destilada	1 litro
Gentamicina o estreptomycin	10 mg/ml 0.025 gr/1lt	Gentamicina o estreptomycin	10 mg/ml 0.025 gr/1lt

Nota: Luego de la preparación llevar a la autoclave para después agregarle el antibiótico.

#### B) Lavado y búsqueda de ovocitos.

**Tabla N° 07** Preparación del medio de lavado y búsqueda de ovocitos

COMPONENTES	1 LITRO
KCl	8 gr
NaCl	0.2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.9 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 gr
PVA	1 gr

Nota: Luego de la preparación llevar a la autoclave para después colocar en refrigeración.

**C) Maduración *in vitro*.**

**Tabla N° 08** Preparación del medio de maduración.

COMPONENTES	2 ml
TCM-199	1.8 ml
Piruvato	20 mg/ml
FSH	50 µl
LH	50 µl
SFB	200 µl
EGF	12 µl
HMG	30 µl

**D) Fecundación *in vitro***

**Tabla N° 09** Preparación de medio SOF base modificado.

SALES	100 ml	50 ml
NaCl	0.6294 gr	0.3147 gr
KCl	0.0534 gr	0.0267 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0162 gr	0.0081 gr
NaHCO <sub>3</sub>	0.210615 gr	0.1053075 gr
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.018 gr	0.009 gr
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.00996 gr	0.00498 gr
Na – Piruvato	3.3 mg	1,65 mg
Na – Lactato	47 µl	23.5 µl
L - Glutamina	0.0146 gr	0.0073 gr
Kanamicina	0.0080 gr	0.004 gr
Rojo fenol	0.0002 gr	0.0001 gr
BSA	0.30 gr	0.15 gr

**Tabla N° 10** Preparación del medio de fecundación y capacitación

SALES	3 ml
SOF base	3 ml
Heparina	24 µl

**Tabla N° 11** Preparación de percoll

a) Preparación de percoll al 100%

<b>Percoll 100%</b>	<b>45 ml</b>	<b>29 ml</b>
PBS 10X	4.5 ml	2.8 ml
Percoll	40.5 ml	25.2 ml

b) Preparación de percoll al 90%

<b>Percoll 90%</b>	<b>50 ml</b>	<b>14 ml</b>
PBS 1X	5 ml	1.4 ml
Percoll 100%	45 ml	12.6 ml

c) Preparación de percoll a 45%

<b>PERCOLL 45%</b>	<b>50 ml</b>	<b>14 ml</b>
PBS 1X	27.5 ml	7.7 ml
Percoll 90%	22.5 ml	6.3 ml

**Tabla N° 12** Preparación de medio PBS 10X – 1X

a) Preparación de medio PBS 10X

<b>SALES</b>	<b>1 litro</b>
NaHPO <sub>4</sub>	14.2 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.01 gr
KCl	2.01 gr
NaCl	80.06 gr

b) Preparación de medio PBS 1X

<b>SALES</b>	<b>10 ml</b>
Agua ultra pura	9 ml
PBS 10X	1 ml

**E) Cultivo *in vitro***

**Tabla N° 13** Preparación del medio de cultivo

<b>Medio de CIV</b>	<b>25 ml</b>
SOF base	25 ml
Aminoácidos esenciales	20 $\mu$ l
Aminoácidos no esenciales	20 $\mu$ l
Mioinositol	20 $\mu$ l

## 10.2. Proceso para la producción de embriones *in vitro*.



**Imagen N° 01** Preparación de medios



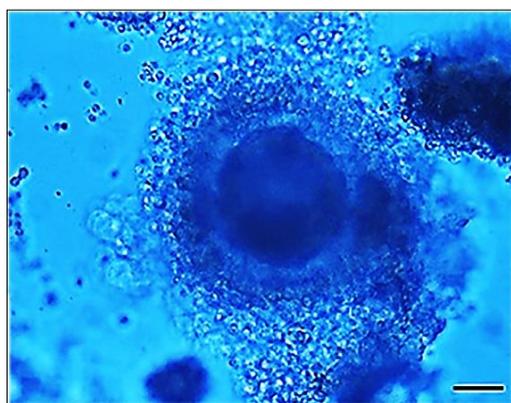
**Imagen N° 02** Almacenamiento de medios



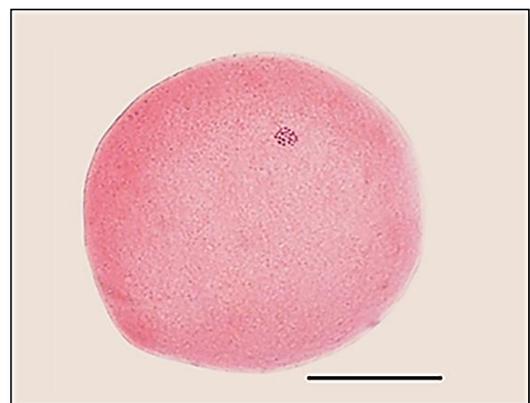
**Imagen N° 03** Colecta de ovarios



**Imagen N04** Aspiración de ovocitos



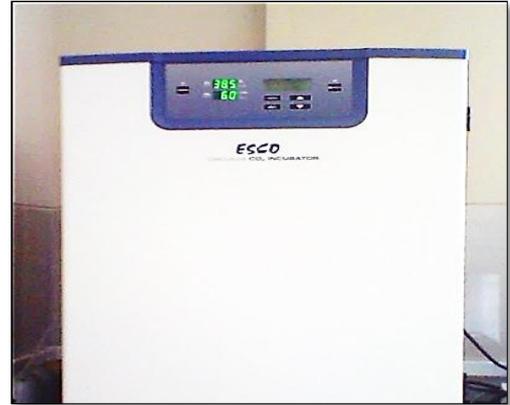
**Imagen N° 05** Ovocito categoría A



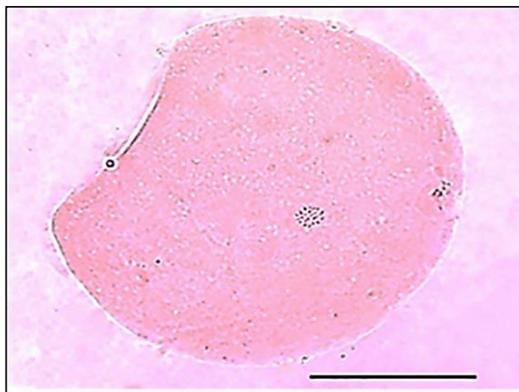
**Imagen N° 06** Tinción de ovocito con acetorceina



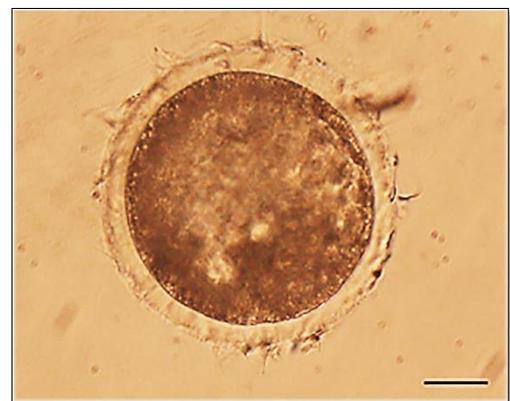
**Imagen N° 07** Selección de COCs



**Imagen N° 08** Incubación de ovocitos



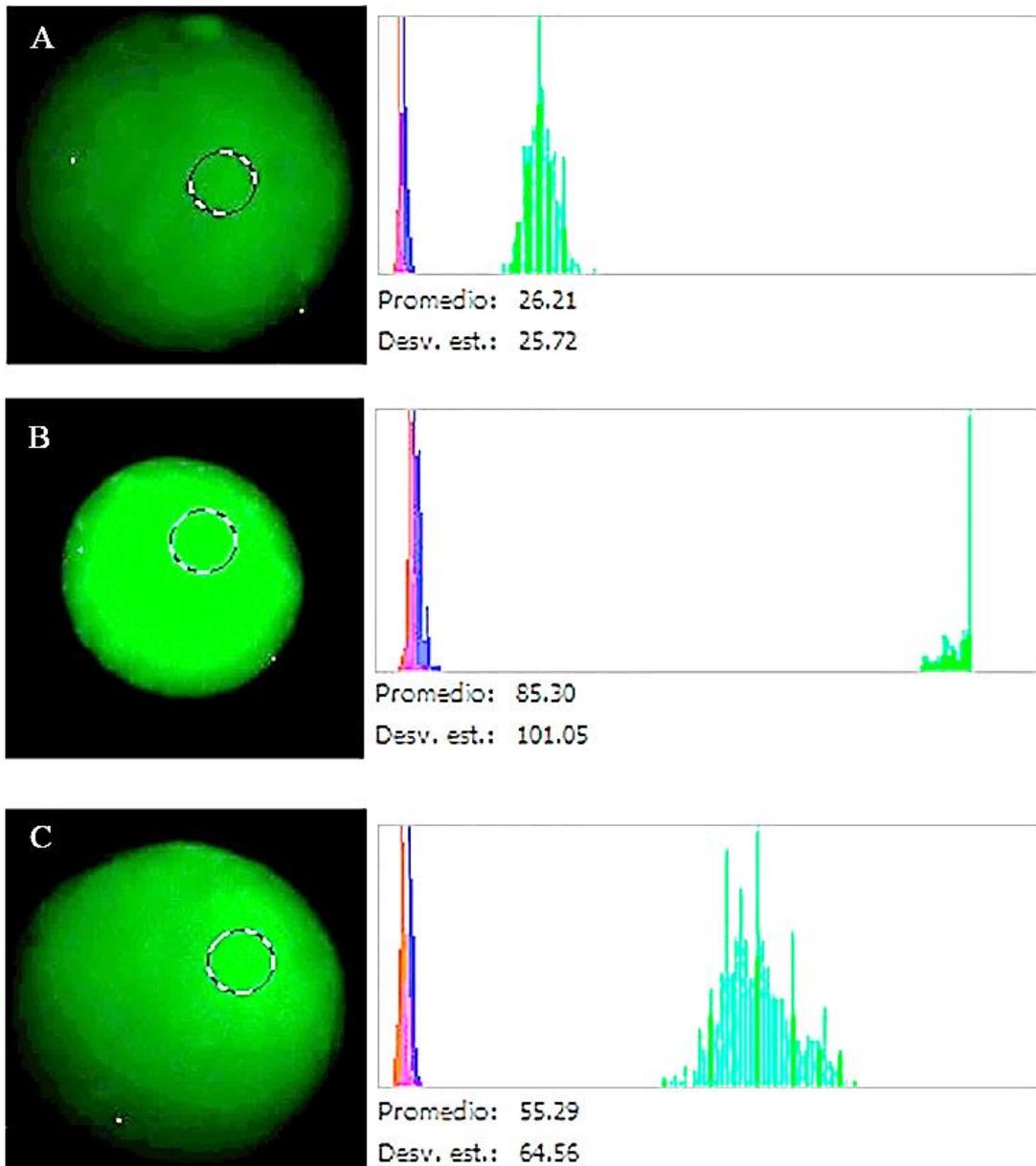
**Imagen N° 09** Ovocito en metafase II



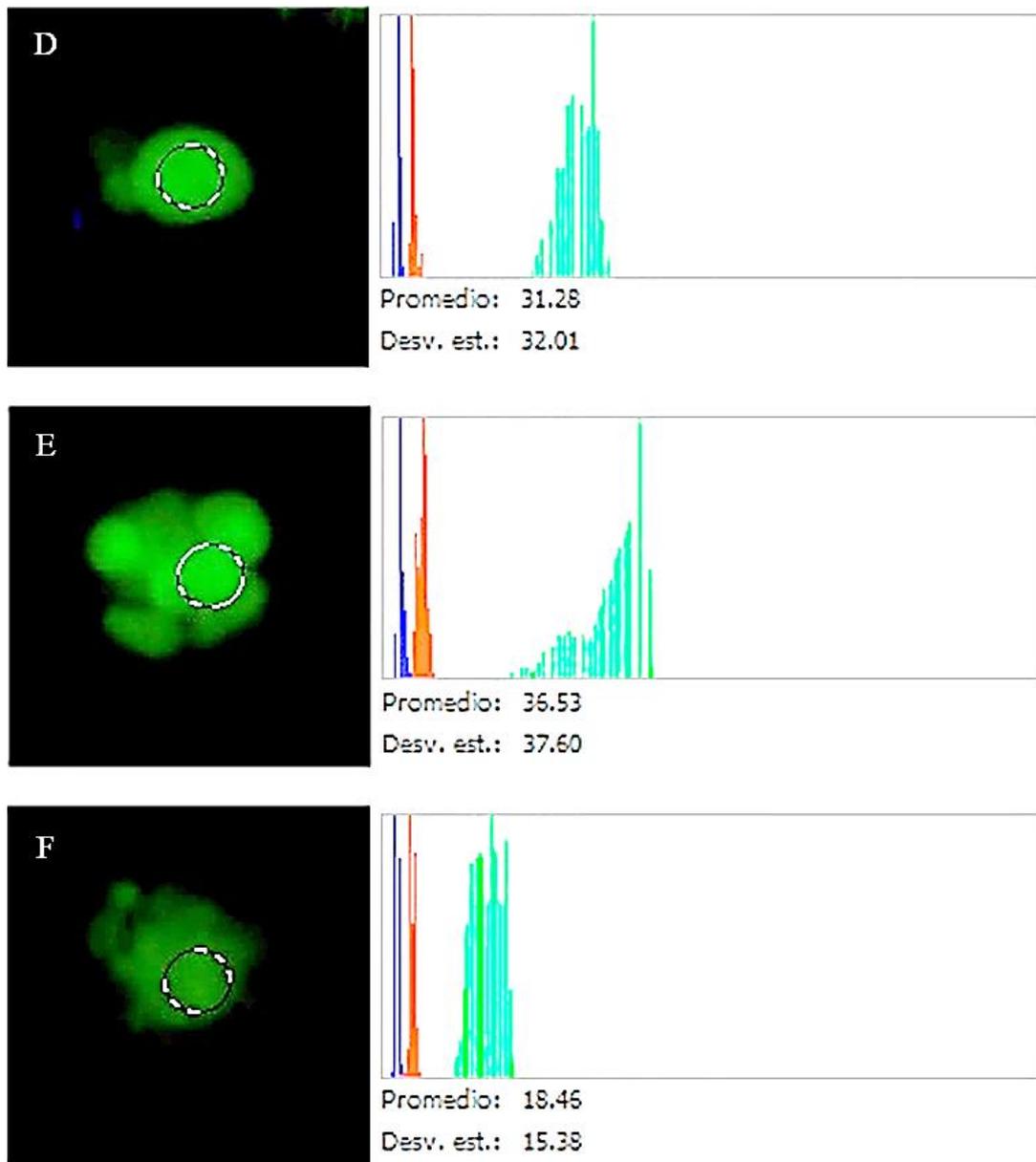
**Imagen N° 10** Blastocisto inicial



**Imagen N° 11** Blastocisto expandido



**Imagen N° 12 A-C:** Embriones cultivados con cocultivo



**Imagen N° 13 D-F:** Embriónes cultivados sin cocultivo

### 10.3. Análisis estadísticos.

#### Pruebas T de dos muestras para CIGOTOS por SISTEMA

SISTEMA	Media	N	SD	SE
1	14.271	7	1.711	0.6465
2	14.271	7	1.711	0.6465

Diferencia 0.0000

Hipotesis nula: diferencia = 0

Hip alternativa: diferencia  $\neq$  0

#### 95% CI por diferencia

Supocición	T	DF	P	Izquierda	Derecha
Igualdad de varianza	0.00	12	1.0000	-1.9921	1.9921
Desigualdad de varianza	0.00	12.0	1.0000	-1.9921	1.9921

Prueba de Igualdad de varianzas	F	DF	P
	1.00	6,6	0.5000

Casos incluidos 14 Casos perdidos 0

#### Pruebas T de dos muestras para MÓRULA por SISTEMA

SISTEMA	Media	N	SD	SE
1	25.714	7	11.57	4.3737
2	20.429	7	5.827	2.2023

Diferencia 5.2857

Hipotesis nula: diferencia = 0

Hip alternativa: diferencia  $\neq$  0

#### 95% CI por diferencia

Supocición	T	DF	P	Izquierda	Derecha
Igualdad de varianza	1.08	12	0.3016	-5.3837	15.955
Desigualdad de varianza	1.08	8.9	0.3089	-5.8188	16.39

Prueba de Igualdad de varianzas	F	DF	P
	3.94	6,6	0.0597

Casos incluidos 14 Casos perdidos 0

### Pruebas T de dos muestras para BLASTOCISTO INICIAL por SISTEMA

SISTEMA	Media	N	SD	SE
1	20.571	7	7.9970	3.0226
2	22.000	7	5.0332	1.9024

Diferencia -1.4286

Hipotesis nula: diferencia = 0

Hip alternativa: diferencia  $\neq$  0

#### 95% CI por diferencia

Supocición	T	DF	P	Izquierda	Derecha
Igualdad de varianza	-0.40	12	0.6962	-9.2100	6.3529
Desigualdad de varianza	-0.40	10.1	0.6975	-9.3746	6.5175

Prueba de Igualdad de varianzas	F	DF	P
	2.52	6,6	0.1422

Casos incluidos 14 Casos perdidos 0

### Pruebas T de dos muestras para BLASTOCISTO por SISTEMA

SISTEMA	Media	N	SD	SE
1	5.0000	7	4.5826	1.7321
2	7.2857	7	5.2190	1.9726

Diferencia -2.2857

Hipotesis nula: diferencia = 0

Hip alternativa: diferencia  $\neq$  0

#### 95% CI por diferencia

Supocición	T	DF	P	Izquierda	Derecha
Igualdad de varianza	-0.87	12	0.4010	-8.0053	3.4339
Desigualdad de varianza	-0.87	11.8	0.4013	-8.0159	3.4445

Prueba de Igualdad de varianzas	F	DF	P
	1.30	6,6	0.3801

Casos incluidos 14 Casos perdidos 0

### Pruebas T de dos muestras para BLASTOCISTO EXPANDIDO por SISTEMA

SISTEMA	Media	N	SD	SE
1	2.1429	7	2.6726	1.0102
2	1.4286	7	3.7796	1.4286

Diferencia 0.7143

Hipotesis nula: diferencia = 0

Hip alternativa: diferencia  $\neq$  0

#### 95% CI por diferencia

Suposición	T	DF	P	Izquierda	Derecha
Igualdad de varianza	0.41	12	0.6903	-3.0978	4.5264
Desigualdad de varianza	0.41	10.8	0.6911	-3.1454	4.5739

Prueba de Igualdad de varianzas	F	DF	P
	2.00	6,6	0.2099

Casos incluidos 14 Casos perdidos 0

### Pruebas T de dos muestras para DEGENERADOS por SISTEMA

SISTEMA	Media	N	SD	SE
1	46.5710	7	13.5630	5.126
2	48.8570	7	11.5820	4.378

Diferencia -2.2857

Hipotesis nula: diferencia = 0

Hip alternativa: diferencia  $\neq$  0

#### 95% CI por diferencia

Suposición	T	DF	P	Izquierda	Derecha
Igualdad de varianza	-0.34	12	0.7404	-16.9730	12.402
Desigualdad de varianza	-0.34	11.7	0.7406	-17.013	12.442

Prueba de Igualdad de varianzas	F	DF	P
	1.37	6,6	0.3556

Casos incluidos 14 Casos perdidos 0

**Pruebas T de dos muestras para CALIDAD por SISTEMA**

<b>SISTEMA</b>	<b>Media</b>	<b>N</b>	<b>SD</b>	<b>SE</b>
1	51.4010	7	26.5590	10.04
2	27.2860	7	8.5294	3.224

Diferencia 24.116

Hipotesis nula: diferencia = 0

Hip alternativa: diferencia  $\neq$  0

**95% CI por diferencia**

<b>Supocición</b>	<b>T</b>	<b>DF</b>	<b>P</b>	<b>Izquierda</b>	<b>Derecha</b>
Igualdad de varianza	2.29	12	0.0411	1.1438	47.088
Desigualdad de varianza	2.29	7.2	0.0549	-0.659	48.89

<b>Prueba de Igualdad de varianzas</b>	<b>F</b>	<b>DF</b>	<b>P</b>
	9.70	6,6	0.0071

Casos incluidos 14 Casos perdidos 0