

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

FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y  
BIOTECNOLOGÍA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA



**EVALUACIÓN DE LA CATEGORÍA DEL ÓVULO EN LA  
PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS Y SU  
SUPERVIVENCIA A LA POSTVITRIFICACIÓN**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE  
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**PRESENTADO POR:**

Autor : Bach. María Santos Abanto López  
Asesor(a) : PhD. Ilse Silvia Cayo Colca  
Co asesor : PhD. Manuel Emilio Milla Pino

CHACHAPOYAS – PERÚ  
2017

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado principalmente a mi hija, Alma, que es el motivo de todos los esfuerzos realizados y la fuerza que empuja cada uno de mis pasos para seguir con mis metas trazadas; también a mis queridos padres, Manuel y Esther por brindarme su paciencia y su apoyo incondicional para lograr mis objetivos, a mis hermanos, Valia y Andrés, por su cariño, a mis abuelitos Alberto, Francisca, Malaquías y María, por sus bendiciones y mis tías Rosa y María que me brindaron su apoyo, cariño y buenos consejos siempre.

*Alma*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi asesora, Ilse Silvia Cayo Colca, que formó parte muy importante en mi formación profesional desde que la conocí, por todo lo que aprendí de ella; tanto en lo académico como en cada uno de sus consejos para mi formación personal; también al Dr. Jhony Gonzales Malca, Dr. Manuel Emilio Milla Pino y al Dr. Oscar Gamarra Torres que gracias a su profesionalismo y su apelación por la justicia me ayudaron a culminar esta etapa. Así como también agradezco a todas las demás personas que me dieron su apoyo en los momentos difíciles y a la Universidad Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas por mi formación Académica y el apoyo por sus laboratorios, equipamiento e insumos brindados para el desarrollo de la investigación.

*Alma*

**AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

**Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI  
RECTOR**

**Dr. MIGUEL ANGEL BARRENA GURBILLÓN  
VICERRECTOR ACADÉMICO**

**Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN  
VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN**

**M.SC. HÉCTOR VLADIMIR VASQUEZ PÉREZ  
DECANO(E) DE LA FACULTAD DE INGENIERIA ZOOTECNISTA  
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA**

## **VISTO BUENO DEL ASESOR**

Yo, PhD. Ilse Silvia Cayo Colca, identificada con DNI N° 09820879, docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, asesora de la tesis: “Evaluación de la categoría del óvulo en la *producción in vitro* de embriones bovinos y su supervivencia a la post vitrificación”, presentado por:

Bach. MARÍA SANTOS ABANTO LÓPEZ

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

**VISTO BUENO DEL JURADO**

---

**Ing. WIGOBERTO ALVARADO CHUQUI**

**PRESIDENTE**

---

**Ing. MsC. ARMSTRONG BARNARD FERNÁNDEZ JERI**

**SECRETARIO**

---

**Ing. MsC. ERICK ALDO AUQUIÑIVIN SILVA**

**VOCAL**

## DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo, María Santos Abanto López, identificado con DNI 47196968 estudiante de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:  
“Evaluación de la categoría del óvulo en la producción *in vitro* de embriones bovinos y su supervivencia a la post vitrificación”  
La misma que presento para optar:
2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo a título profesional.
5. los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 12 de diciembre del 2017

# TABLA DE CONTENIDOS

	PÁGINAS
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
AUTORIDADES UNIVERSITARIAS	iii
VISTO BUENO DEL ASESOR	iv
VISTO BUENO DEL JURADO	v
ACTA DE NO PLAGIO	vi
TABLA DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I. Introducción	1
II. Objetivos	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
III. Marco teórico	3
3.1. Antecedentes de la investigación	3
3.2. Bases teóricas	4
3.2.1. Sistema reproductor de la hembra bovina	4
3.2.2. El ovario	6
3.2.3. Ovogénesis	8
3.2.3.1. Formación de óvulos	8
3.2.3.2. Formación de folículos primordiales	8
3.2.3.3. Formación de folículos primarios	10
3.2.3.4. Formación de folículos secundarios	10
3.2.4. Espermatozoide	12



3.2.4.1. Maduración del espermatozoide	12
3.2.4.2. Capacitación del espermatozoide	13
3.2.4.3. Hiperactivación y quimiotaxis	16
3.2.5. Producción <i>in vitro</i> de embriones	16
3.2.5.1. Obtención de óvulos	17
3.2.5.2. Selección de óvulos	18
3.2.5.3. Maduración <i>in vitro</i> del óvulo	19
3.2.5.4. Fecundación <i>in vitro</i> del óvulo	21
3.2.5.5. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	22
3.2.6. Criopreservación de embriones bovinos	23
3.2.6.1. Componentes de la solución vitrificante	23
3.2.6.2. Empaque Cryotop	24
IV. Material y métodos	25
4.1. Recuperación de ovarios	25
4.2. Obtención de óvulos	25
4.3. Maduración <i>in vitro</i>	27
4.4. Fecundación <i>in vitro</i>	30
4.5. Cultivo <i>in vitro</i>	33
4.6. Vitricación de embriones	35
4.7. Descongelamiento de los embriones <i>in vitro</i>	35
4.8. Análisis de datos	40
V. Resultados	41
VI. Discusión	46
VI Conclusiones	48
VI Recomendaciones	49
IX. Referencias bibliográficas	50
X Anexos	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

## PÁGINAS

Figura 1.	Aparato reproductor de la hembra bovina.	5
Figura 2.	Ovario de la hembra bovina.	7
Figura 3.	Foliculogénesis de la hembra bovina	9
Figura 4.	Desarrollo del folículo antral	11
Figura 5.	Estructura del espermatozoide bovino	14
Figura 6.	Fecundación del óvulo con el espermatozoide	15
Figura 7.	Categoría de los óvulos bovinos	20
Figura 8.	Extracción de ovarios de la hembra bovina	26
Figura 9.	Obtención de óvulos bovinos	28
Figura 10.	Maduración <i>in vitro</i> de óvulos	29
Figura 11.	Análisis de pajillas de semen	31
Figura 12.	Método de la gradiente de Percoll	32
Figura 13.	División embrionaria	34
Figura 14.	Vitrificación de embriones	36
Figura 15.	Empaque de vitrificación, Cryotop.	37
Figura 16.	Blastocisto post vitrificación	38
Figura 17.	Ruptura de la membrana embrionaria post-vitrificación a las 24 horas	39
Figura 18.	Porcentajes de maduración <i>in vitro</i> por categoría	42
Figura 19.	Porcentaje de segmentación embrionaria	43
Figura 20.	Desarrollo embrionario (Blastocistos) al séptimo día post cultivo	44
Figura 21.	Desarrollo embrionario al noveno día (Blastocistos eclosionados)	45
Figura 22.	Panel fotográfico	63

## ÍNDICE DE TABLAS

## PÁGINAS

Tabla N° 1	Competencia de maduración <i>in vitro</i> según la categoría de óvulos	42
Tabla N° 2.	Segmentación embrionaria a las 48 horas post fecundación de óvulos.	43
Tabla N° 3.	Producción de embriones <i>in vitro</i> (Blastocisto)	44
Tabla N° 4.	Eclosión de blastocistos.	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

## PÁGINAS

Anexo 1.	Medio de transporte de ovarios	54
Anexo 2.	Medio de búsqueda y lavado de óvulos	54
Anexo 3.	Medio de maduración <i>in vitro</i>	55
Anexo 4.	Medio de selección espermática	56
Anexo 5.	Medio de capacitación espermática	56
Anexo 6.	Medio de fecundación <i>in vitro</i>	57
Anexo 7.	Medio de cultivo <i>in vitro</i>	57
Anexo 8.	Estadísticas tabuladas: CATEGORÍA, MADURACIÓN	58
Anexo 9.	Estadísticas tabuladas: CATEGORIA, SEGMENTADOS	59
Anexo 10.	Estadísticas tabuladas: CATEGORIA, BLASTOCISTOS	60
Anexo 11.	Estadísticas tabuladas: CATEGORIA, ECLOSIONADOS	61
Anexo 12.	Panel fotográfico	62

## ABREVIATURAS

CGP	Células germinales primordiales
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
COCs	Complejo cúmulus ovocito
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo estimulante
HMG	Hormona gonadotrofina menopáusica humana
IETS	International Embryo Technology
LH	Hormona luteinizante
MII	Metafase II
MII	Metafase II
MIV	Maduración <i>in vitro</i> de embriones
OPU	Ovum Pick Up
PIV	Producción <i>in vitro</i>
PIVE	Producción <i>in vitro</i> de embriones
PVA	Alcohol Polivinílico
SFB	Suero fetal bovino
TCM	Medio de cultivo tisular

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló para estandarizar un protocolo de producción de embriones *in vitro* y criopreservación, a partir de dos categorías de óvulos bovinos (A y B).

Se utilizó óvulos recuperados por aspiración folicular de los ovarios de bovinos hembras del centro de beneficio de Chachapoyas. Se determinó el porcentaje de: maduración, segmentación, embriones hasta blastocisto y blastocisto eclosionado para las dos categorías (A y B). Sólo se halló que la categoría del óvulo influye sobre las tasas de segmentación hasta las 48 horas post inicio del cultivo (82% y 75%, respectivamente) ( $P > 0.05$ ). Para el protocolo de vitrificación se utilizó 5 embriones en estadio de blastocisto producidos a partir de cada categoría de óvulos. Sin embargo; el protocolo usado no permitió establecer la existencia o no de deficiencias entre ambas categorías.

El protocolo usado en este trabajo es óptimo para la producción *in vitro* de embriones, su validación debe ser comprobada en campo en futuras investigaciones. El protocolo de criopreservación de embriones, requiere de mayor estudio.

Palabras clave: Óvulos, embriones, *in vitro*, criopreservación, vitrificación.

## ABSTRACT

The present research work was developed to standardize an *in vitro* embryo production protocol and cryopreservation, from two categories of bovine oocytes (A and B).

Follicular aspiration of the ovaries of female bovines from the Chachapoyas benefit center was used. The percentage of maturation, segmentation, embryos to blastocyst and blastocyst hatched for the two categories (A and B) was determined. It was only found that the category of the oocyte influences the segmentation rates until 48 hours after the start of culture (82% and 75%, respectively) ( $P > 0.05$ ). For the vitrification protocol, five blastocyst stage embryos produced from each category of oocytes were used. Nevertheless; the protocol used did not allow to establish the existence or not of deficiencies between both categories.

The protocol used in this work is optimal for the *in vitro* production of embryos; its validation must be proven in the field in future research. The embryo cryopreservation protocol requires further study.

Key words: Ovules, embryos, *in vitro*, cryopreservation, vitrification.

## I. Introducción

El consumo de leche y carne aumenta gradualmente cada año. En los últimos años su incremento fue de 87 litros a casi 120 litros por persona al año. Del mismo modo, la producción de carne de vacuno en este primer trimestre del año, alcanzó las 90 mil toneladas de peso en pie. Esta cifra es superior en 1.5% en comparación al año pasado, cuando se logró una producción de 89 mil toneladas (MINAGRI, 2017).

Este crecimiento va de la mano con el uso de las biotecnologías reproductivas que permiten mejorar eficazmente la ganadería bovina, porque reducen los intervalos generacionales y acelera el progreso genético. Una de las biotecnologías más importantes es la producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos.

En el 2015, la IETS, reportó 612.709 embriones *in vitro* transferibles producidos por OPU y 58.402 producidos a partir de óvulos derivados de centros de beneficio, disponibles para transferencias. La eficiencia de la PIVE, resulta no mayor al 30% y con protocolos que varían según los laboratorios y sus objetivos.

La mayoría de los embriones por PIV son transferidos en fresco y esto trae como consecuencia sincronizar un mayor número de receptoras. Además, la falta de receptoras conlleva al descarte de embriones. Por tal motivo, se crea la necesidad de desarrollar protocolos de criopreservación de embriones para evitar el descarte de los mismos. Así mismo, el estudio sobre el efecto que causa la criopreservación en los embriones obtenidos por fertilización *in vitro* (FIV) daría mayor información para mejorar los protocolos usados en la actualidad.

Se sabe que, existe una relación directa entre la calidad morfológica de los óvulos con la PIVE, pero es muy subjetiva y los criterios de evaluación dependen del investigador. Por lo tanto, la clasificación minuciosa en dos categorías; A (excelente) y B (buena), podrían mejorar los parámetros actuales de la PIVE.



Es consecuencia, el presente trabajo tiene como objetivo la producción de embriones *in vitro* a partir de óvulos de dos categorías (A y B) provenientes de bovinos hembras del centro de beneficio de Chachapoyas. Así mismo, la evaluación de la supervivencia a la criopreservación de dichos embriones para la estandarización de protocolos en el laboratorio.

## **II. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general:**

Determinar el efecto de las categorías A y B de óvulos, en la maduración, segmentación postfecundación, producción de embriones, eclosión y su supervivencia a la postvitrificación.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Caracterizar los óvulos de la categoría A y B.
- Identificar los daños postdescongelación.
- Estandarizar y validar técnicas de producción y criopreservación de embriones *in vitro*.

### **III. Marco teórico**

#### **3.1. Antecedentes de la investigación**

Desde el nacimiento del primer becerro producido con la técnica de fertilización *in vitro* (FIV) en 1981 (Brackett *et al.*, 1982), se ha logrado considerables progresos en el desarrollo de la técnica para la PIVE. Sin embargo, la tasa de la PIVE todavía permanece baja debido a diversos factores (Hansen, 2006). La PIVE en el Perú, data del año 2003, y son pocos los laboratorios que desarrollan las técnicas. En la actualidad, se han reportado tasas de producción de embriones menores al 30 %, que utilizan diferentes protocolos, medios de cultivo, equipos, entre otros (Pahuara y Naveros, 2014).

En la PIVE, existen aspectos determinantes para el éxito de la técnica (Báez *et al.*, 2010). Los reportes señalan que se debe tomar en cuenta la calidad, el tamaño y la categoría del óvulo (Stojkovic *et al.*, 2001). De igual modo, se sugiere que el tamaño folicular influye sobre la calidad de los óvulos usados en la PIVE (Segura, 2015). Por lo tanto, es importante seleccionar minuciosamente los óvulos para la producción de embriones. También es necesario definir un protocolo para cada paso de los sistemas y métodos de cultivo que puedan permitir la obtención de los embriones FIV (Ahumada, 2009).

En la actualidad, se desarrollan diversos métodos de criopreservación, entre los métodos existentes, tenemos los de congelamiento lento y rápido, este último; conocido como vitrificación aún continúa en estudio. Se realizaron investigaciones evaluando el efecto de varios factores sobre la supervivencia de los embriones vitrificados. Entre los factores evaluados, se encuentra la presión, el material empleado, los crioprotectores usados, entre otros (Abón, 2012).

## **3.2. Base teórica**

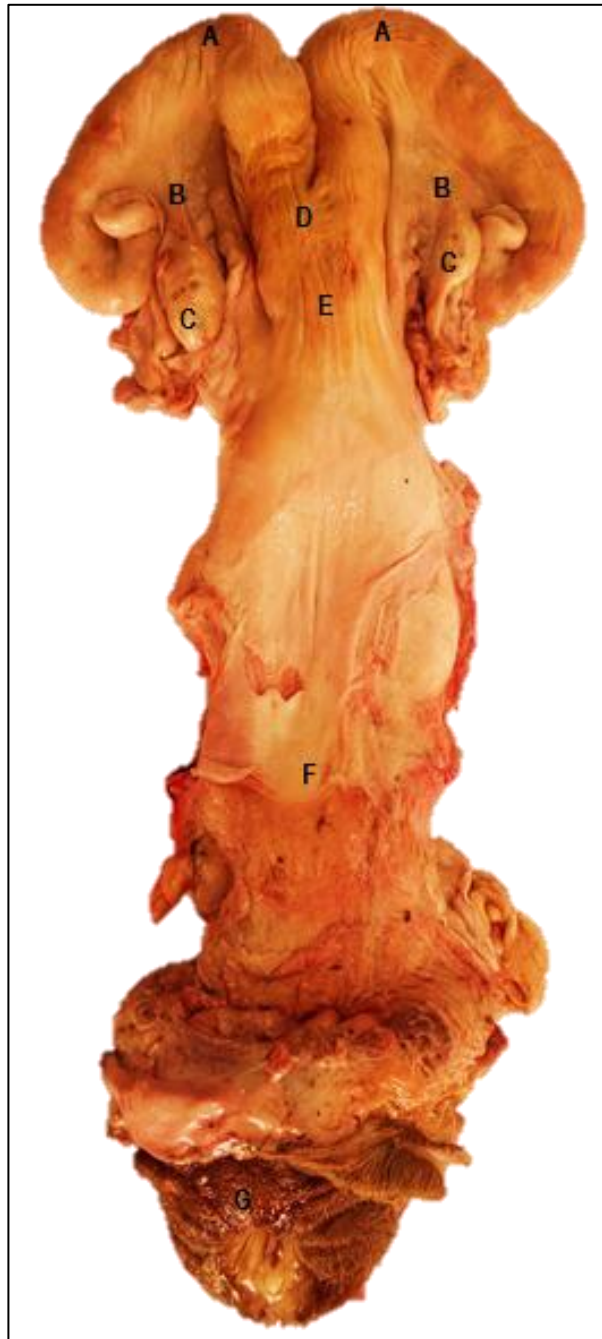
### **3.2.1. Sistema reproductor de la hembra bovina**

La hembra bovina, además de aportar la célula sexual femenina para el desarrollo de un nuevo individuo, proporciona el ambiente donde será concebido y alimentado durante sus primeros días de vida. Aquí intervienen los órganos primarios y secundarios de la reproducción. Los órganos primarios están compuestos por los ovarios que producen los óvulos y las hormonas femeninas. Los órganos secundarios están conformados por el oviducto, útero, cérvix o cuello uterino, vagina y la vulva (Hafez, 2002).

Los órganos reproductores de la hembra bovina se forman mucho antes del nacimiento. Después de nacer se desarrollan gradualmente hasta que alcanza su actividad sexual y es capaz de concebir y producir un becerro. (Hafez, 2002).

Los ovarios normales de la hembra bovina son ovoideos. Los ovarios miden de 3-4,5 cm de longitud, 2-3 cm de altura y 1-2 cm de ancho, aunque la presencia de folículos en desarrollo y de cuerpos lúteos, altera su forma y tamaño (Hafez, 2002).

El ambiente uterino, también es importante para el desarrollo de los embriones transferidos. El flujo vaginal, las secreciones hormonales, la presencia de estructuras, conllevan al éxito o fracaso de la técnica de la PIVE. La ausencia de infecciones o inflamaciones, es otro factor que contribuye al éxito o fracaso de la técnica, ya que esto influye en el pH uterino (Hafez, 2002).



**Figura 1. Aparato reproductor de la hembra bovina**

El aparato reproductor de la hembra bovina está compuesto por (A) cuernos del útero, (B) oviducto, (C) ovarios, (D) cuerpo del útero, (E) cérvix, (F) vagina y (G) vulva.

Fuente: propia.

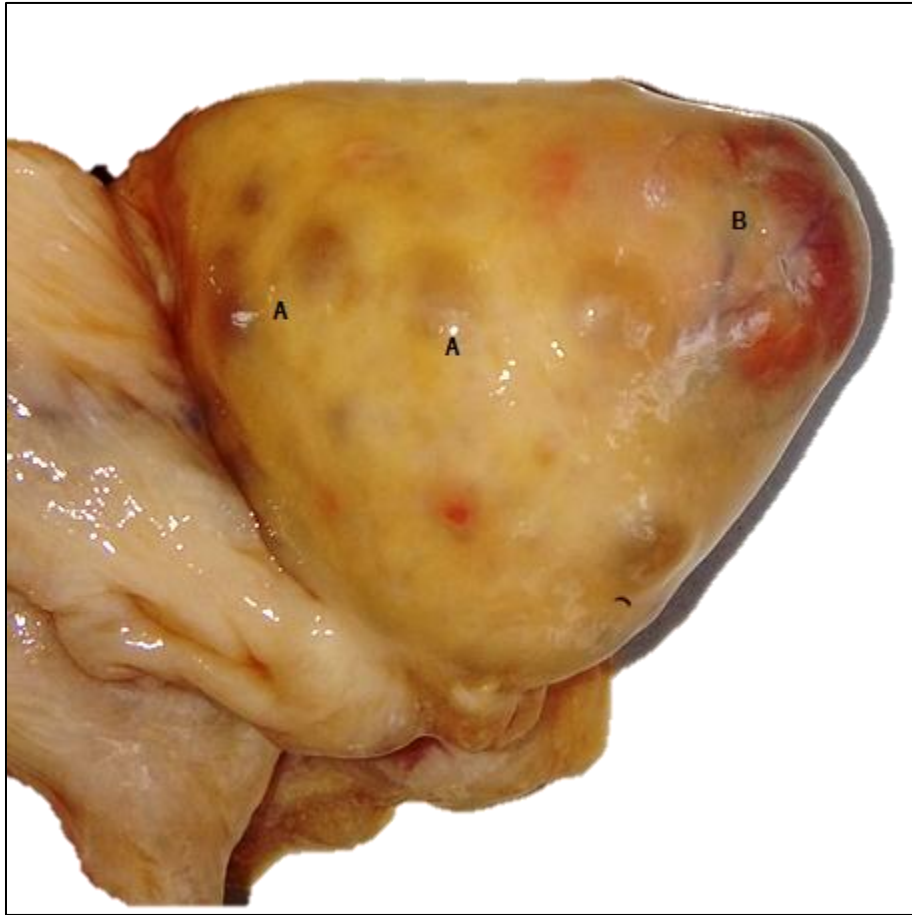
### **3.2.2. El ovario**

El ovario bovino contiene dos partes; médula y corteza. Dependiendo del ciclo estral, puede contener un cuerpo lúteo transitorio y miles de folículos en diferentes etapas de desarrollo. La médula es interna y está compuesta de tejido conectivo y vasos sanguíneos. La corteza es externa y contiene las estructuras ováricas; tales como, los folículos y el cuerpo lúteo (Hafez, 2002).

En el ovario se da lugar la foliculogénesis; que es el proceso de desarrollo en el que un folículo primordial activado se desarrolla hasta un tamaño preovulatorio en sincronía con el crecimiento y diferenciación del óvulo y de las células de la granulosa circundantes. Los folículos se pueden clasificar como primordiales, primarios, secundarios y de Graaf o preovulatorio (Hafez, 2002).

La iniciación del crecimiento folicular, comienza con la transformación de las células “pre-granulosas” que son aplanadas en el folículo primordial a una sola capa de células granulomatosas de forma cuboidal. Esta estructura se conoce como folículo primario. Además de ello, se inicia la formación de la zona pelúcida en el óvulo, así como la proliferación de las capas de las células de la granulosa (Hafez, 2002).

En el folículo primario se continúa con la proliferación de células de la granulosa que da lugar a un aumento en el número de capas alrededor del óvulo. Además, se inicia la formación del antro folicular. Esta estructura es denominada folículo secundario. En el folículo secundario se diferencia las células de la teca interna y externa. Un folículo con más de seis capas de células de la granulosa y un antro lleno de líquido se conoce como un folículo terciario (o antral) (Gordon, 2003).



**Figura 2. Ovario de la hembra bovina**

En la figura se aprecia diferentes estructuras ováricas externas; (A) folículo, (B) cuerpo lúteo.

Fuente: propia.

### **3.2.3. Ovogénesis**

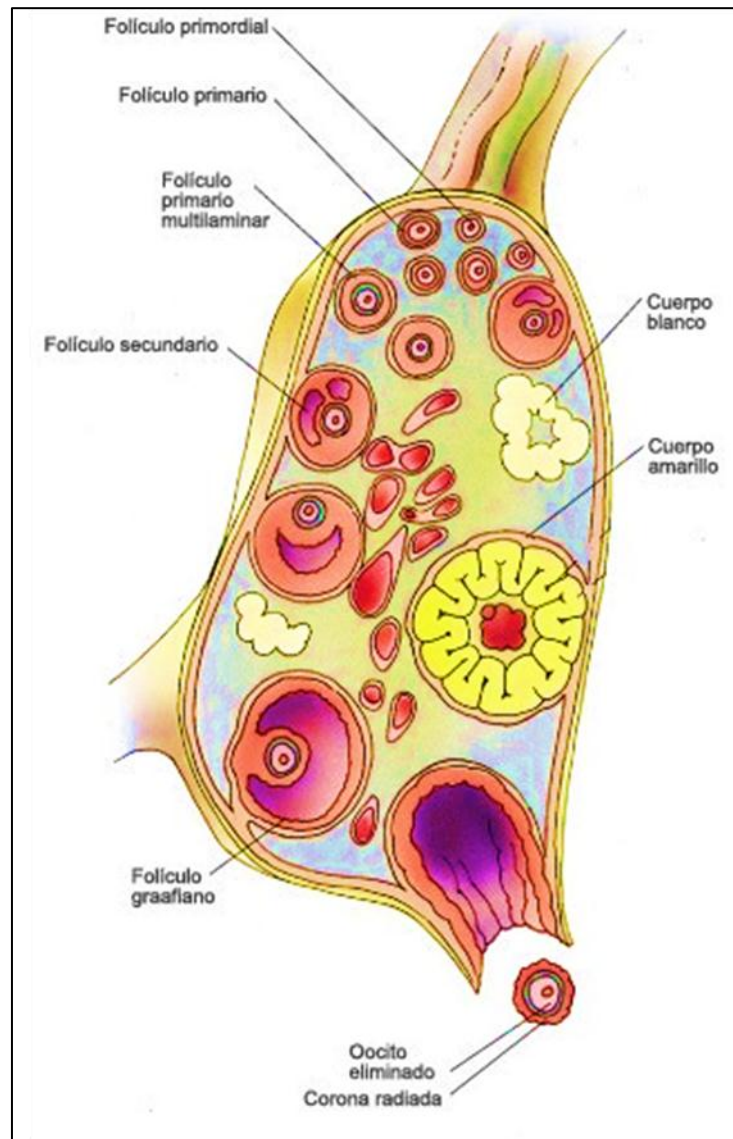
La ovogénesis es el proceso que da origen a los gametos femeninos. Estos se denominan óvulos y están encargados de aportar el complemento haploide de cromosomas que, junto con el del espermatozoide, darán origen a un nuevo individuo. En los mamíferos, la ovogénesis comienza precozmente durante el desarrollo del feto y culmina años más tarde al momento de la ovulación (Aerts y Bols, 2010). La ovogénesis se inicia en la etapa fetal con la formación de las células germinales primordiales (CGP) que sufren una serie de cambios para transformarse en óvulos primarios (ambos estadios en el feto) y llegar al estadio de óvulo secundario en el animal adulto (Aerts y Bols, 2010).

#### **3.2.3.1. Formación de óvulos**

Los óvulos se forman a partir de un pequeño número de CGP de origen extragonadal (Aerts y Bols, 2010). El proceso de formación del óvulo se inicia con la generación de las CG, su migración a las gónadas, la colonización de las gónadas por las CGP, su diferenciación a ovogonias, la proliferación de las ovogonias por mitosis, la iniciación de la meiosis y por último, el arresto meiótico en estadio de diploteno de la profase I (Van Den Hurk y Zhao, 2005).

#### **3.2.3.2. Formación de folículos primordiales**

Con la iniciación de la meiosis, surgen los folículos primordiales que se componen de un óvulo rodeado por una capa de células somáticas escamosas planas (células pregranulosas). En la mayoría de las especies, las células pregranulosas tienen un origen dual a partir de células epiteliales de la superficie, que migran hacia el interior del ovario (Sawyer *et al.*, 2002).



**Figura 3. Foliculogénesis de la hembra bovina**

En la figura se aprecia las diferentes fases de crecimiento de un óvulo apto para la fecundación.

Fuente: Adaptado de Van Den Hurk y Zhao, (2005).



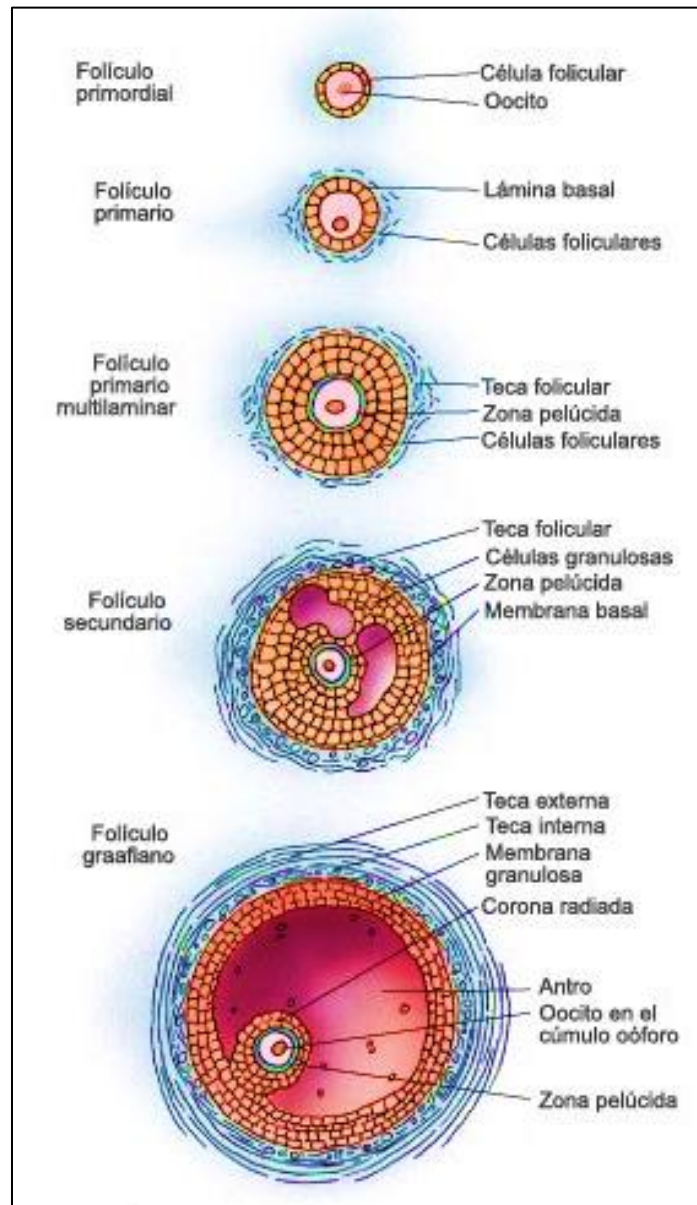
Durante el inicio de la actividad meiótica, gran parte de los óvulos degeneran, y el número de folículos primordiales presentes en el ovario disminuye al momento del nacimiento. El pool de folículos primordiales se caracteriza por mantener una relativa quiescencia hasta poco antes de la pubertad, momento en que el ovario comienza a ser receptivo a las hormonas gonadotróficas (Eichenlaub-Ritter y Peschke, 2002).

#### **3.2.3.3. Formación de folículos primarios**

Los folículos primordiales están quiescentes hasta que son reclutados durante la fase de crecimiento. Durante la pubertad y adultez, un grupo de folículos son reclutados y transformados en folículos antrales. A partir de este momento el folículo comienza a crecer en un proceso continuo que está regulado por el ovario y en el cual, el óvulo y las células foliculares que lo rodean crecen coordinadamente, progresando a través de una serie de estadios morfológicos definidos que culminan en la ovulación de un óvulo maduro o en la atresia folicular (Moniruzzaman y Miyano, 2010).

#### **3.2.3.4. Formación de folículos secundarios**

Las capas de células foliculares cúbicas del folículo primario pasan a constituir las células de la granulosa. Alrededor de éstas, se desarrolla una capa de células que forman la teca a partir de células del estroma intersticial. De esta manera, queda constituido el folículo multilaminar (también llamado secundario o preantral) (Young y McNeilly, 2010). Estas células, además de comunicarse entre ellas, forman uniones nexo (gap) con el oolema del óvulo (Heikinheimo y Gibbons, 1998). Este tipo de uniones actúan como mediadores de la comunicación intercelular, permitiendo el pasaje de pequeñas moléculas que influyen sobre las células contiguas, como por ejemplo nutrientes, precursores metabólicos (como aminoácidos y nucleótidos) y moléculas de señalización como hormonas y factores de crecimiento (Van Den Hurk y Zhao, 2005).



**Figura 4. Desarrollo del folículo antral**

En la figura se aprecia el folículo antral de bovino con el óvulo adherido a las células de la granulosa

Fuente: Gordon (1996).

Durante la fase de crecimiento, el óvulo permanece detenido en diploteno de la primera profase meiótica y aumenta su volumen hasta 500 veces. La cantidad de citoplasma aumenta por acumulación de sustancias de reserva, produciéndose un incremento en la síntesis de ARN. Además, aumenta el número de mitocondrias, se forman los gránulos corticales que contienen mucopolisacáridos y enzimas proteolíticas que se ubican por debajo de la membrana plasmática, se forman microvellosidades en la membrana citoplasmática y se observa la zona pelúcida. Esta última, está constituida por glicoproteínas que intervienen en la unión con el espermatozoide (Wassarman, 1990).

#### **3.2.4. Espermatozoide**

Los espermatozoides surgen de una población de células madres espermatogónicas que derivan a su vez de las células germinales primordiales (CGP) presentes a lo largo del desarrollo fetal.

Durante la formación del alantoides, las CGP son desplazadas fuera del embrión antes de iniciar la migración a través del intestino caudal hacia las gónadas indiferenciadas. Las CGP darán lugar a los gonocitos, que son encerrados en los cordones testiculares formados por células precursoras de las células de Sértoli y de las células mioides peritubulares.

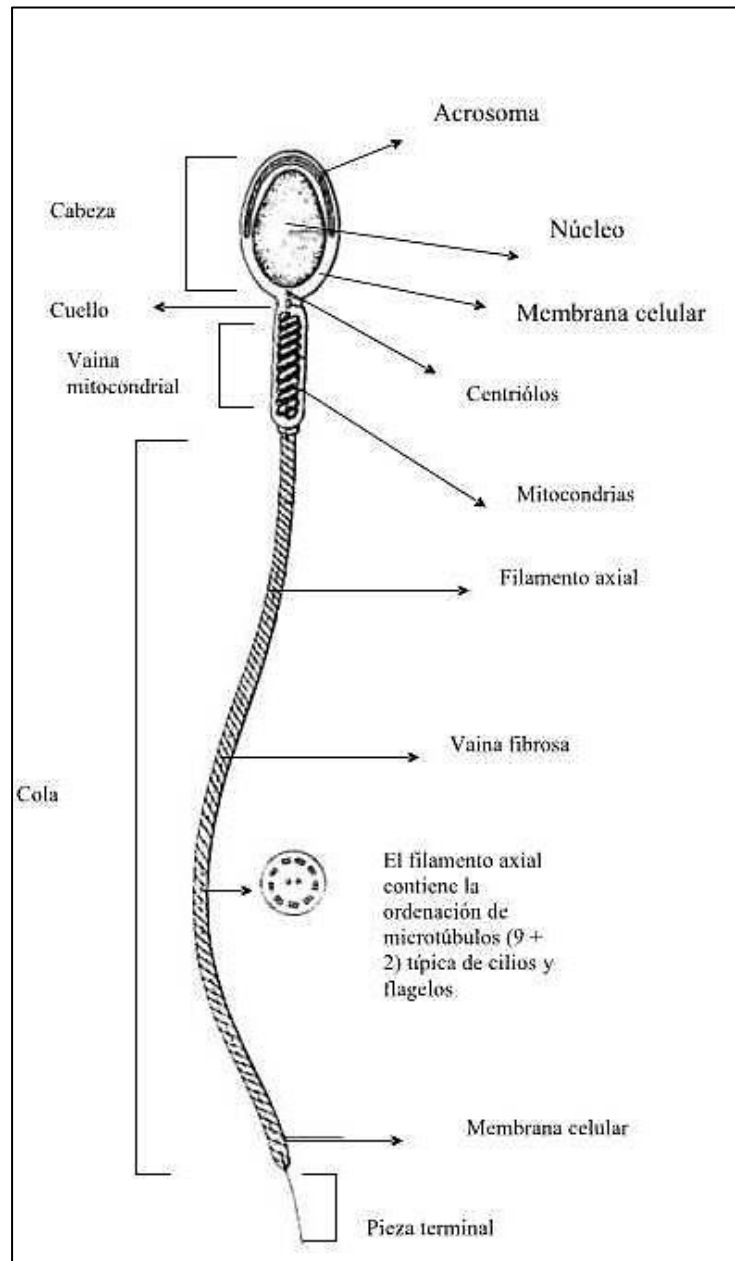
##### **3.2.4.1. Maduración del espermatozoide**

Los espermatozoides en el lumen no han completado su diferenciación y son incapaces de fertilizar el óvulo. La capacidad fecundante se consigue en el epidídimo, donde el espermatozoide maduro adquiere motilidad progresiva y también la habilidad de lograr la reacción acrosómica, reconocer y unirse a la zona pelúcida, y la capacidad de fusionarse a la membrana vitelina del óvulo (Otero, 2008).

Los cambios estructurales que sufre el espermatozoide, incluyen la migración de la gota citoplasmática, la remodelación acrosomal, los cambios en la cromatina y en algunas de las organelas del flagelo, y los cambios en los lípidos de membrana y proteínas de superficie (Robaire *et al.*, 2006).

#### **3.2.4.2. Capacitación del espermatozoide**

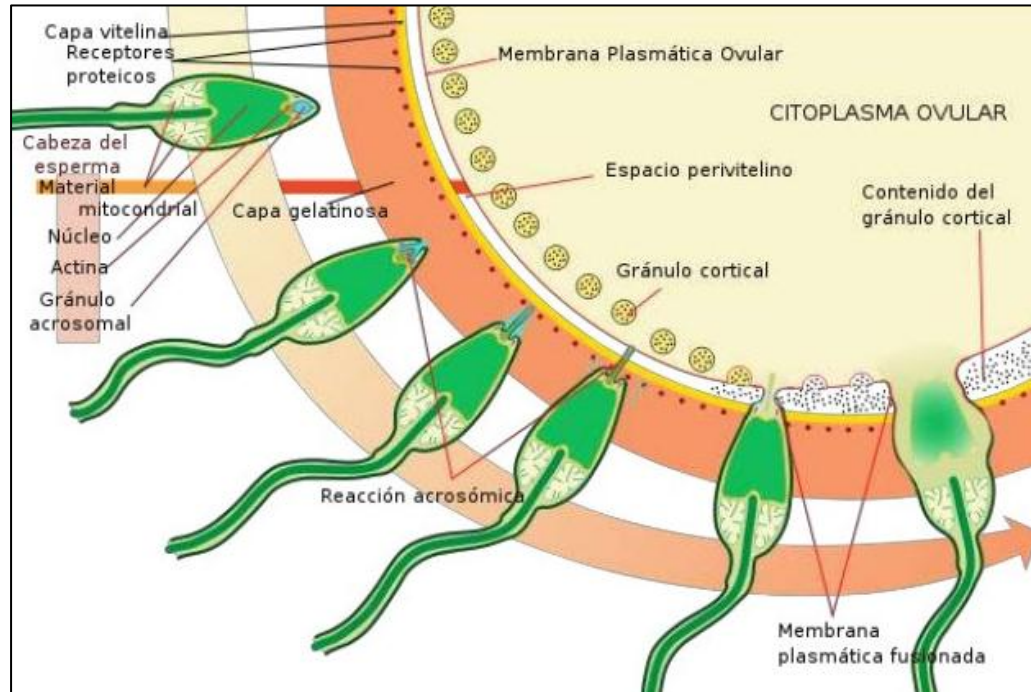
La capacitación espermática, consiste en alteraciones de la membrana plasmática, tales como la eliminación de los factores de decapitación y la eliminación del colesterol, la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a la célula, el aumento del pH intracelular, y el aumento de la fosforilación proteica, así como la hiperpolarización de la membrana (Robaire *et al.*, 2006).



**Figura 6. Estructura del espermatozoide bovino**

En la figura se observa las partes principales del espermatozoide bovino; la cabeza, el cuello y la cola.

Fuente: Hidalgo *et al.*, 2005



**Figura 5. Fecundación del óvulo con el espermatozoide**

En la figura se aprecia el contacto del espermatozoide (singamia) y su entrada hacia el óvulo y la fusión de sus núcleos (cariogamia).

Fuente: Moore (2007).

#### **3.2.4.2. Hiperactivación y quimiotaxis**

Los espermatozoides sufren, además de la motilidad progresiva, adquirida durante la maduración epididimal, un tipo de movimiento (característico para cada especie) llamado motilidad hiperactiva. La primera se caracteriza por un movimiento flagelar vigoroso, de baja amplitud y larga longitud de onda y relativamente simétrico de avance lineal. Por otro lado, con los agentes capacitantes, el espermatozoide desarrolla movimientos de hiperactivación, caracterizados 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 (Robaire *et al.*, 2006).

El fenómeno de hiperactivación sirve para atravesar la matriz extracelular del cúmulus y de la zona pelúcida del óvulo. Los espermatozoides de varias especies de mamífero son orientados hacia el óvulo mediante el fenómeno de quimiotaxis, que consiste en la atracción de los espermatozoides por los óvulos. Los espermatozoides son direccionados hacia una gradiente de concentración de sustancias quimioatrayentes aportadas por el óvulo maduro y las células del cúmulus (Eisenbach y Giojolas, 2006).

#### **3.2.5. Producción *in vitro* de embriones**

Los primeros trabajos de investigación realizados en la PIVE de bovinos datan de la década de los 70 (Mahi y Yanagimachi, 1976), esto surge como una alternativa al aprovechamiento de la genética bovina. Desde el nacimiento del primer becerro producto de la técnica de FIV en 1981 (Brackett *et al.*, 1982) logró considerables progresos en el desarrollo de las técnicas para la PIVE. Sin embargo, la tasa de producción *in vitro* de blastocistos, todavía permanece menor al 30% (Hansen, 2006).

En los porcentajes actuales de embriones producidos *in vitro*, tenemos los reportados por la IETS (2015), con más de medio millón de embriones FIV en el año 2015, que representa el 42 % de los embriones producidos en el 2015

(Blondin, 2015). También, se han reportado diversas tasas de producción de embriones en los diferentes laboratorios, utilizando distintos medios y protocolos de cultivo (Pahuara y Naveros, 2014 ).

La PIVE en bovinos, es una técnica donde el espermatozoide es capaz de unirse y penetrar al óvulo para formar un nuevo individuo bajo condiciones de laboratorio (fuera del organismo animal) (Hernández, 2005).

### **3.2.6. Obtención de óvulos**

Existen diferentes técnicas de recuperación del complejo cúmulus óvulos (COCs) según se trate de animales vivos o de centros de beneficio, como es el caso de esta investigación. Los ovarios colectados de hembras faenadas son transportados en termos con solución salina a 35-37 °C hasta el momento de la aspiración de los COCs, dentro de las primeras 4 a 6 horas después de faenados los animales (Filipak y Larocca, 2010).

Las técnicas que se emplean son dos. La técnica de “slashing”; que consiste en hacer cortes superficiales en la corteza del ovario con lavados simultáneos para que caigan los óvulos. La otra técnica es conocida como “aspiración folicular”; que consiste en la aspiración de folículos de diámetros que van de 3-6 mm utilizando una jeringa (Fernández *et al.*, 2007).

La metodología de extracción de óvulos de animales vivos es conocida como ovum pick up (OPU). Esta técnica consiste en la aspiración directa de óvulos por medio de un transductor acoplado a una guía de aguja y con ayuda de un equipo de ultrasonografía (Denis, 2008).

Los folículos seleccionados no deben tener indicios de atresia folicular. El diámetro de los folículos está entre 2 y 8 mm. Luego de ser aspirados, los óvulos son clasificados y madurados en presencia de hormonas para garantizar la meiosis (maduración nuclear y citoplasmática). Con la aspiración con



jeringa, en comparación con la técnica de “slashing”, se obtiene un mayor número de óvulos recuperados, pero de baja calidad. Esto se debe a que se recuperan óvulos de folículos muy pequeños no antrales que no han alcanzado el tamaño adecuado para ser madurados *in vitro* (Filipak y Larocca, 2010).

### **3.2.7. Selección de los óvulos**

La vaca es una especie mono-ovulatoria. La mayoría de los óvulos conseguidos tras la aspiración folicular están destinados a degenerar, debido a ello se deben clasificar y separar según la calidad de los óvulos antes de utilizarlos para la maduración *in vitro*. Solo una parte tiene la capacidad de ser fecundados y soportar el desarrollo embrionario (Herradón *et al.*, 2007).

La selección de los óvulos se realiza habitualmente en base a tres criterios (Herradón *et al.*, 2007). El primer criterio es el diámetro del óvulo, que condiciona su capacidad para madurar (Sato *et al.*, 1990; Fair *et al.*, 1995), de tal forma que los óvulos bovinos con un diámetro inferior a 110  $\mu\text{m}$  se hallan todavía en fase de crecimiento y no han logrado aún la competencia meiótica (Calado, 2001).

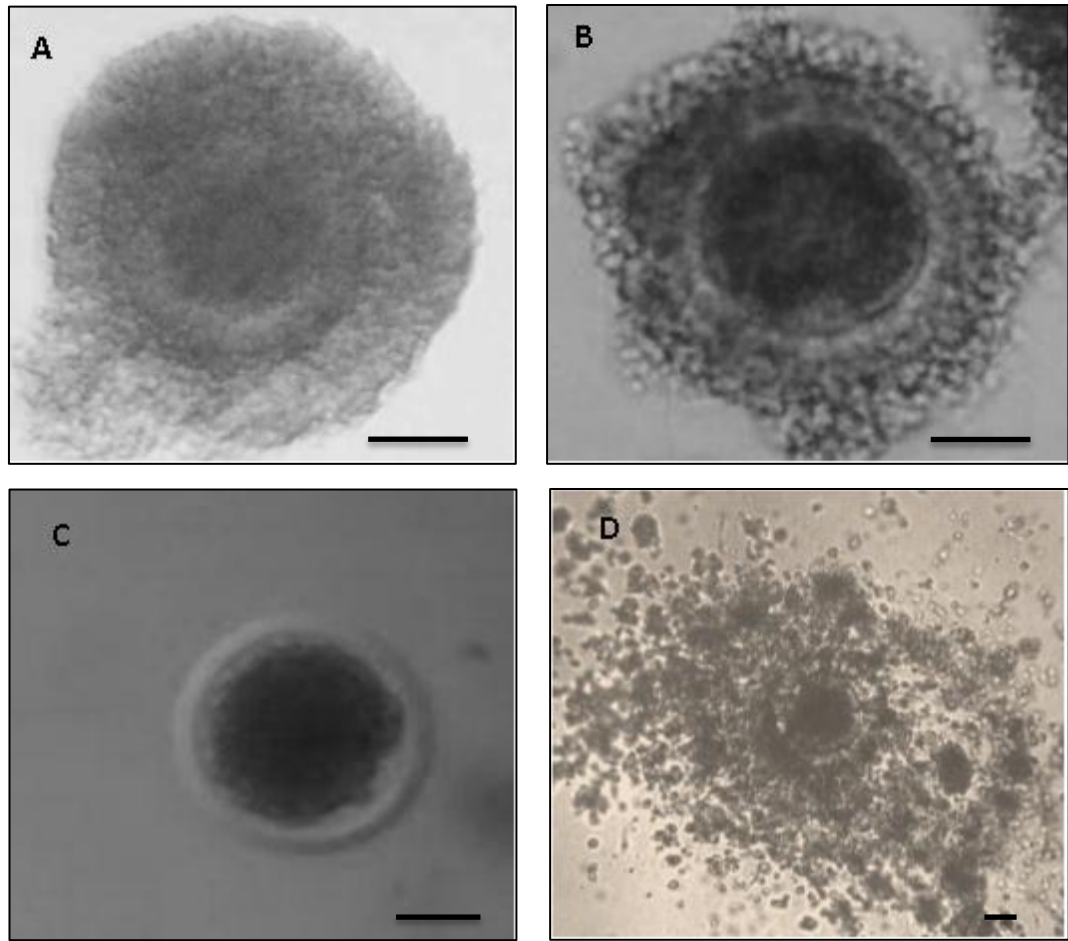
El segundo criterio es el aspecto de su citoplasma, este tiene relación con la competencia meiótica, capacidad de ser fecundado y competencia del desarrollo embrionario (Nagano *et al.*, 1999). Los óvulos que presentan un citoplasma oscuro muestran una acumulación de lípidos y un buen potencial para el desarrollo, mientras que los que son pálidos tienen baja densidad de orgánulos e insuficiente potencial de desarrollo. Cuando el citoplasma es negro, los óvulos están envejecidos y su desarrollo es muy bajo (Calado, 2001).

Finalmente, las características del cúmulo que rodea al óvulo, también puede darnos un indicativo de su calidad; un cúmulo compacto formado por varias capas de células, demuestran mayores porcentajes de maduración,

fecundación y de desarrollo hasta blastocistos, que los que carecen de cúmulo o los que están rodeados solamente por la corona radiata (Stojkovic *et al.*, 2001).

### **3.2.8. Maduración *in vitro* del óvulo**

Durante la maduración *in vitro*, el óvulo progresa desde el estadio de profase de la primera división meiótica (MI) hasta la metafase de la segunda división meiótica (MII). Durante este evento (en un periodo de 24 horas), se completa la maduración citoplasmática y nuclear en respuesta a las hormonas del medio de cultivo. La meiosis culmina luego que el óvulo es fecundado. Finalmente los pronúcleos masculino y femenino se forman y se inicia la segmentación embrionaria (Hernández, 2005).



### **Figura 7. Categoría de los óvulos bovinos**

En la figura se observa el óvulo de categoría excelente (A), completamente rodeado por más de 3 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo, óvulo categoría buena (B), rodeado parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular, óvulo categoría regular (C) desnudo y óvulo de categoría degenerada (D) rodeado por células degeneradas (con aspecto de tela de araña) (Liebfried y First 1979; Sato *et al.*, 1990). La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Fuente: propia.

Durante de la maduración nuclear, es importante que exista una maduración citoplasmática en sincronía. Los óvulos reanudan espontáneamente la meiosis, al ser aspirados de los folículos y cultivados *in vitro*. La composición de los medios de cultivo y el ambiente controlado de la incubadora, deben brindar un ambiente adecuado de un modo similar a lo que sucede *in vivo* (Filipak y Larocca, 2010).

### **3.2.9. Fecundación *in vitro***

Para lograr la fecundación *in vitro* los óvulos, se incuban junto con los espermatozoides capacitados en un medio suplementado con fuentes energéticas (piruvato o lactato) y albúmina sérica. En la especie bovina, la capacitación espermática es favorecida por la incorporación de heparina al medio (Báez *et al.*, 2010).

Con el fin de lograr el proceso de capacitación, reacción del acrosoma y pasaje a través de las barreras ovocitarias, el semen debe ser tratado antes de cocultivar los espermatozoides con los óvulos. Este tratamiento incluye la eliminación de todos los elementos presentes (plasma seminal, componentes del diluyente del semen descongelado, contaminantes, etc.) y la selección de los espermatozoides vivos con motilidad progresiva (Gordon, 2003).

La separación de espermatozoides vivos se logra mediante técnicas basadas en gradientes de concentración de azúcares (Swim up), gradientes de Percoll y filtración (lana de vidrio). De estas, las más utilizadas son el Swim up y el Percoll. Ya sea por uno u otro método; luego de la separación de los espermatozoides, se inicia la capacitación espermática con heparina, cafeína, epinefrina, entre otros (Hernández, 2005).

Finalmente, se efectúa la dilución y el conteo de los espermatozoides móviles para alcanzar una concentración final de 1-4 millones de espermatozoides por

ml de medio de fecundación dependiendo del protocolo utilizado (Herradón, 2007).

### **3.2.10. Cultivo *in vitro* de embriones**

El cultivo *in vitro* embrionario trata de simular, de manera artificial en la incubadora las condiciones en las que se desarrolla un embrión preimplantacional desde el estadio de cigoto hasta el estadio de blastocisto (Báez *et al.*, 2010)

La composición del medio de cultivo ha evolucionado hasta nuestros días. El cultivo usado se trata de una solución salina suplementada con una fuente de energía (piruvato, glucosa o lactosa) y una fuente proteica (suero o albúmina sérica bovina). Existen algunos medios complejos como el TCM-199, Ham's F10 u otros como es el Syntetic Oviductal Fluid (SOF) ( Fernández *et al.*, 2007).

El desarrollo de las etapas tempranas de división es estimulado por los aminoácidos no esenciales y la glutamina. Mientras que el desarrollo después del día cuatro es estimulado por la combinación de los aminoácidos no esenciales y aminoácidos esenciales y la glutamina (Herradón *et al.*, 2007).

Los medios utilizados para el cultivo de los embriones bovinos han sido clasificados en tres categorías los cultivos indefinidos, utilizan suero y cocultivo con células somáticas. Los cultivos semidefinidos, usan albúmina sérica; y los cultivos definidos usan macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona (Herradón *et al.*, 2007).

### **3.2.11. Criopreservación de embriones bovinos**

Esta técnica surge como consecuencia del aumento en la productividad de animales de alto valor genético, así como la comercialización del material genético a distintos lugares. La cantidad de embriones producidos ha aumentado y sigue aumentando, creando la necesidad de almacenar los embriones excedentes.

Esta técnica permite almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas a bajas temperaturas ( $-196^{\circ}\text{C N}_2$ ), sin que pierdan su capacidad de desarrollo y nacimientos vivos.

En la actualidad, uno de los métodos más utilizados para criopreservar embriones es la vitrificación. Esta técnica permite almacenar germoplasma por tiempo indeterminado y comercializarlos. La técnica de vitrificación alcanza el estado vítreo de la célula, por el rápido enfriamiento de un medio líquido. Evita la formación de cristales de hielo generando elevada viscosidad (Giraldo, 2012).

La técnica es una alternativa competitiva para la vitrificación de embriones, no requiere de costosos equipos, reporta resultados más eficientes y disminuye el daño celular post descongelación (Hoon *et al.*, 2010).

### **3.2.12. Componentes de la solución vitrificante**

**Solución buffer:** esta solución de vitrificación es acuosa, comúnmente es preparada con fosfato bufferado salino (PBS), HEPES-bufferado y medios de cultivo de tejidos (TCM) (Abón, 2012).

**Crioprotectores permeables:** los crioprotectores permeables a la célula son pequeñas moléculas capacitadas para atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva, y son el elemento esencial en la solución vitrificante al trasladar el agua contenida en su interior para disminuir la formación de

cristales de hielo, en donde se encuentran propilenglicol, etilenglicol, glicerol y dimetilsulfoxido (DMSO) (Hoon, *et al.*,2010).

**Crioprotectores no permeables:** polisacáridos que son suplementarios en la solución vitrificante y se usan para aumentar la osmolaridad de la solución, proporcionando de esta forma la salida de agua del interior de la célula, en estos tenemos azucres como sucrosa, galactosa, glucosa, trehalosa, etc.

**Macromoléculas:** no son permeables a células y su trabajo es reducir la toxicidad de los crioprotectores al reducir su concentración en la solución vitrificante, tenemos polyvinylpyrrolidona, albumina sérica y Ficoll-70 (Giraldo, 2012).

**Empaque para vitrificación:** para que la velocidad de enfriamiento sea lo suficientemente rápida para evitar la formación de cristales de hielo, se requiere que el volumen a vitrificar sea lo más pequeño posible para favorecer el intercambio térmico entre la muestra y el nitrógeno líquido.

### **3.2.13. Empaque Cryotop**

Este empaque fue desarrollado principalmente para la vitrificación de óvulos y embriones humanos. Está conformada por una tira de polipropileno fino unida a un mango de plástico (Kuwayama *et al.*, 2005).

La solución de vitrificación, que contiene el óvulo o embrión, se carga en la tira y el exceso de solución puede ser eliminado casi por completo por aspiración. La muestra se sumerge luego en LN2 para la vitrificación y almacenamiento. El Cryotop permite mayores tasas de enfriamiento y calentamiento que las alcanzables con otros empaques (Kuwayama, *et al.*, 2005).

## **IV. Material y métodos**

### **4.1. Recuperación de los ovarios**

La colección de ovarios fue realizada en el Centro de Beneficio Municipal de la ciudad de Chachapoyas, en donde se ingresó con la indumentaria adecuada (guantes, mandil y botas blancas) para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada.

Para este trabajo se utilizaron ovarios provenientes de bovinos hembra cíclicas; una vez faenada y eviscerada, se extrajeron los ovarios. Luego se retiró el tejido circundante con una tijera esterilizada. Inmediatamente después, los ovarios se transportaron al laboratorio, en un recipiente isotérmicos con solución salina (0.9g/l de NaCl) suplementada con 1ml/L de gentamicina (Anexo 1), a una temperatura de 32 a 37°C.

Una vez terminada la recolección de ovarios en un aproximado de 2 horas se llevó el termo hacia el Laboratorio de Biotecnología Animal Reproducción y Mejoramiento Genético.

### **4.2. Obtención de óvulos**

En el laboratorio, en un periodo de tiempo inferior a 3 horas desde su transporte, los ovarios se lavaron 3 veces con solución salina a 38°C.

Los óvulos se aspiraron de folículos de 2-8 mm de diámetro con ayuda de una jeringa y una aguja hipodérmica (18G). El líquido folicular se depositó en un tubo de 15ml en baño María (ESCO, Singapur) a 38°C. Antes de iniciar con la búsqueda de los óvulos, se dejó decantar el líquido colectado por 10 min. Una vez decantado, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se re suspendió con 10 ml de PBS-PVA (Anexo 2).





### **Figura 8. Extracción de ovarios de la hembra bovina**

En la figura se observa a la hembra bovina sacrificada. Los ovarios fueron extraídos con ayuda de una tijera esterilizada.

Fuente: Propia.

Luego, todo el contenido se recuperó en placas Petri con ayuda de un estereoscopio (Olympus, Japón) y una micropipeta (Eppendorf, Alemania) de 20µl para su manipulación.

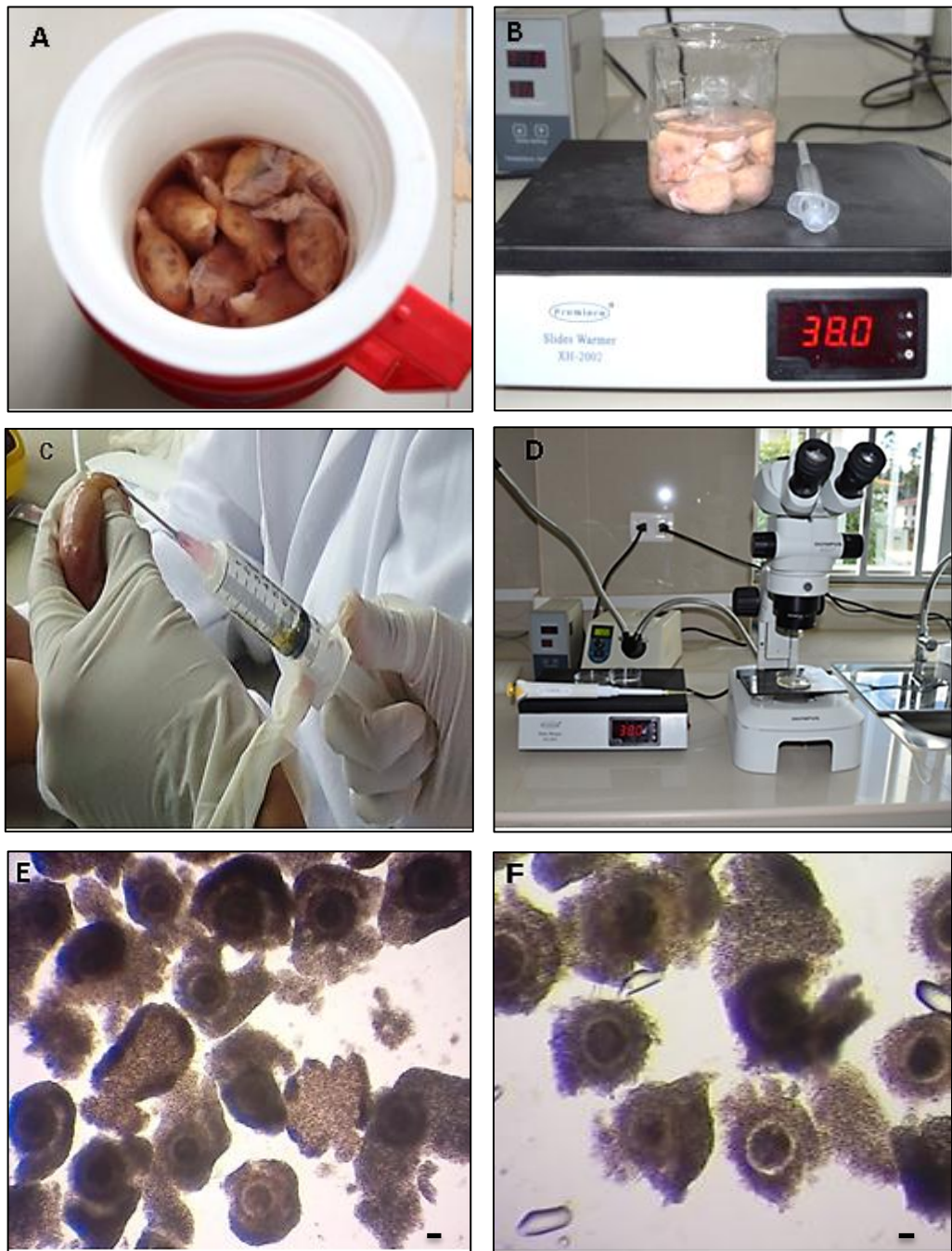
Se seleccionaron únicamente óvulos que poseían 3-4 capas completas y compactas de células del cúmulo y que presentaban un citoplasma homogéneo (Categoría A y B), utilizando la clasificación dada por Liebfried y First (1979).

Los óvulos seleccionados se lavaron 2 veces en PBS - PVA a 38°C para eliminar restos celulares y 1 vez en medio de maduración (Anexo 3) previamente equilibrado en la incubadora a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

#### **4.3. Maduración *in vitro***

Al momento de la aspiración, los óvulos se encuentran en la profase de la primera división meiótica. Al ser expuestos a gonadotrofinas, la meiosis se reinicia. La meiosis se caracteriza tanto por la maduración del óvulos (nuclear y citoplasmática), como por la expansión de las células del cúmulo.

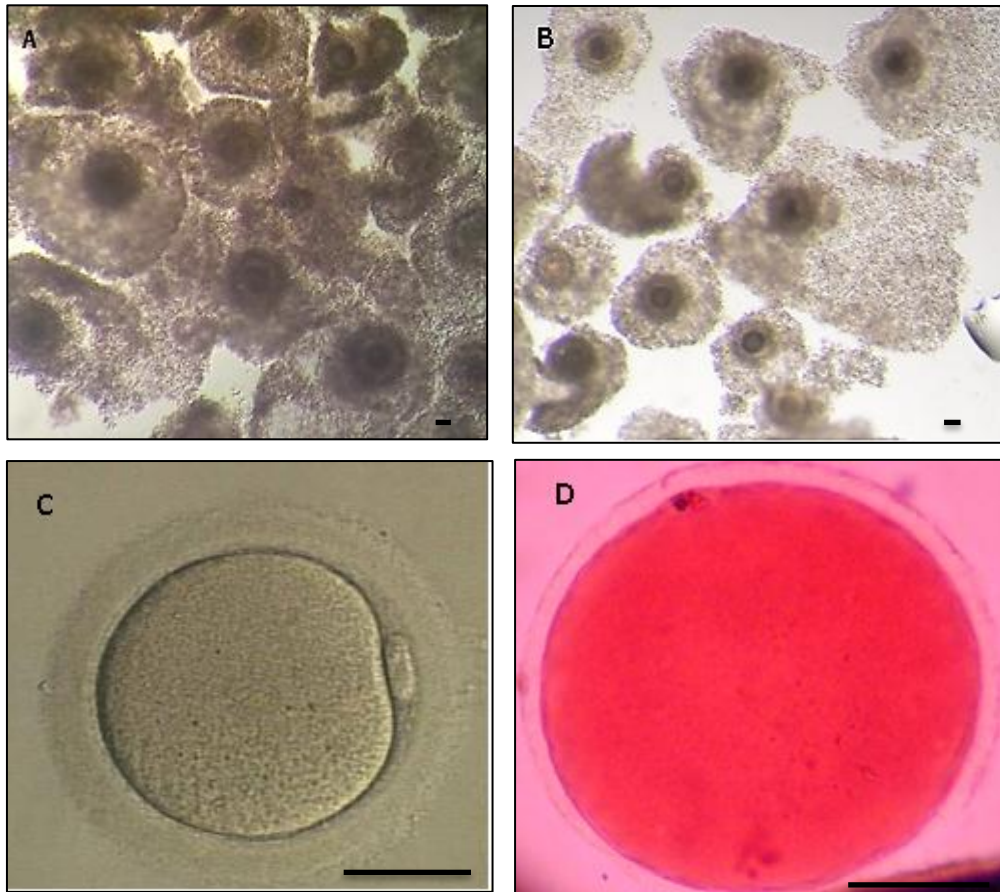
Luego del último lavado con medio de maduración (Anexo 3), los óvulos son expuestos en el mismo medio en gotas de 70µl, cubiertas con aceite mineral en placas Petri de 3mm. Se colocaron 25 óvulos por gota. El medio de maduración conteniendo los óvulos se cultivó en una incubadora a 38.5°C con una concentración de 6% de CO<sub>2</sub> por un tiempo de 24 horas.



**Figura 9. Obtención de óvulos bovinos**

Los ovarios recuperados se transportaron al laboratorio en un termo a 38° C (A). Seguidamente, fueron lavados con solución salina (B); para hacer la aspiración folicular con una aguja N°18 (C). Luego, este líquido recuperado se dejó decantar, para la posterior búsqueda de óvulos en una placa Petri de 100 mm con ayuda de un estereomicroscopio y una micropipeta (D). Finalmente se obtuvieron los óvulos de categoría A (E) Y B (F). La barra indica 50 µm.

Fuente: propia.



### Figura 10. Maduración *in vitro* de óvulos

Los óvulos después de 24 horas expuestas al medio de maduración, presentan la expansión de las células del cúmulo (A y B) y la expulsión del corpúsculo polar (C), que se puede observar al retirar todas las células del cúmulo; esto indica que el óvulo se encuentra en MII. Finalmente, para observar las estructuras celulares se hace una tinción con aceto-orceína (D). La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

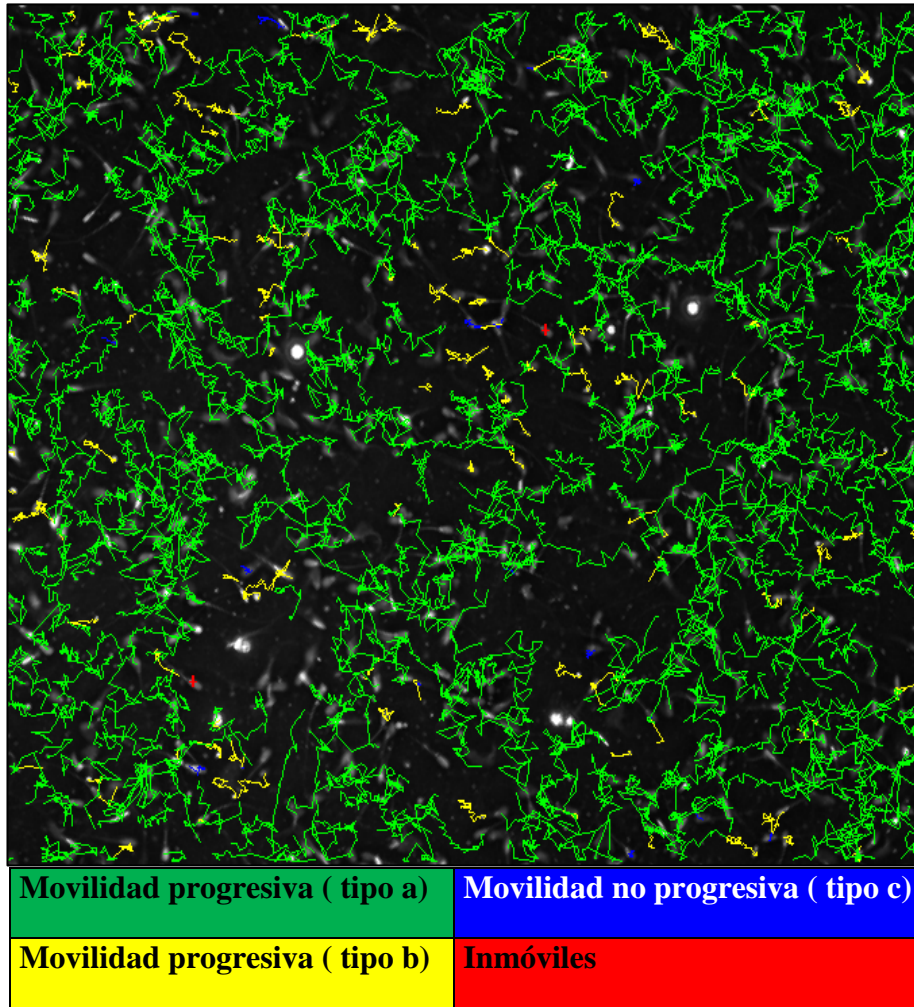
Fuente: propia.

#### **4.4. Fecundación *in vitro***

Antes de la fecundación *in vitro*, los espermatozoides se analizaron con el sistema SCA y tinción con eosina nigrosina. Se evaluó la motilidad y viabilidad de una muestra de pajilla de semen.

Seguidamente, se seleccionaron los espermatozoides por gradiente de Percoll (90% - 45%) (Anexo 4) a 37°C. Se centrifugó la muestra a 2000rpm por 20 minutos y el sobrenadante se eliminó. El pellet se resuspendió con 100µl de medio de capacitación (Anexo 5) que contenía heparina. Luego se centrifugó a 1500rpm por 5 minutos. Se sacó 50µl del pellet y se le agregó 150µl de medio de fecundación (Anexo 6). Finalmente, se incubó por 20 minutos en gotas (70ul). En otra placa de 30mm se incubó 2ml del medio de fecundación por 30 minutos.

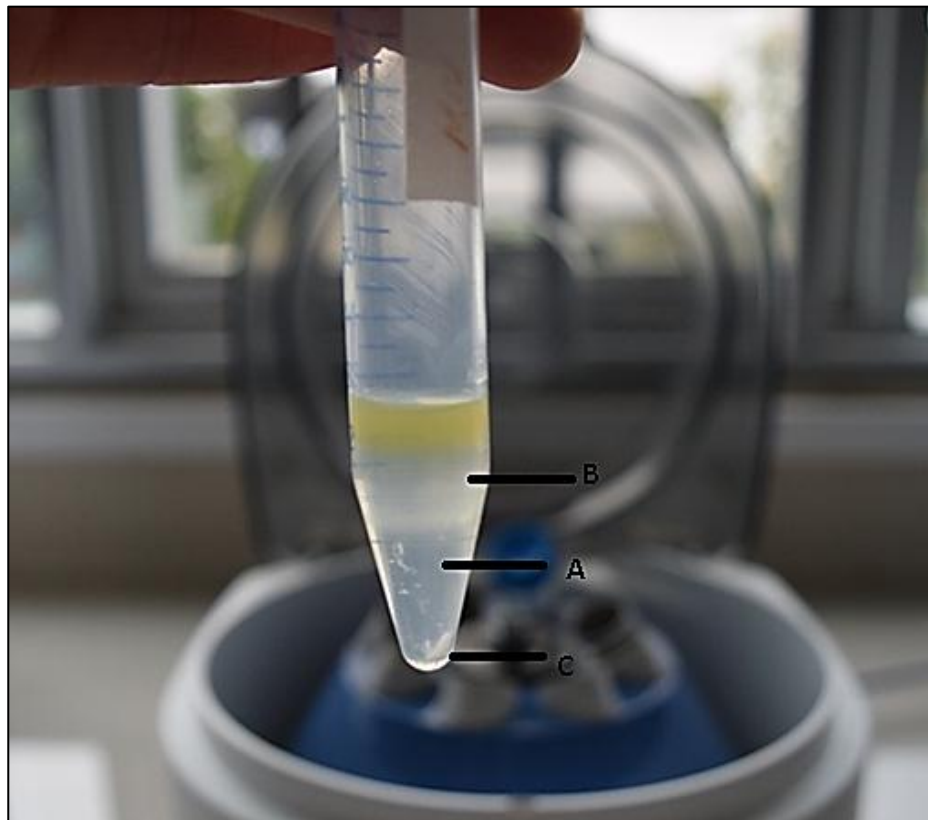
Los óvulos ya madurados *in vitro*, se lavaron con el medio de fecundación, previamente incubados. Luego se colocaron los óvulos en las gotas con los espermatozoides seleccionados y capacitados. La placa se colocó dentro de la incubadora por 18 horas a 38.5°C con 6% CO<sub>2</sub>, para la fecundación.



**Figura 11. Análisis de pajillas de semen**

En la figura se observa el análisis de las pajillas de semen con el sistema SCA, que nos muestra la movilidad de los espermatozoides. Este análisis nos demuestra que los espermatozoides utilizados son aptos para la fecundación *in vitro*.

Fuente: Laboratorio del Banco de semen y embriones (BSE) de la UNTRM.



### **Figura 12. Método de la gradiente de Percoll**

En la figura se observa la selección de espermatozoides aptos para la fertilización. La gradiente de Percoll consta de dos fases de 45 % (B) y 90 % (A). Luego de la centrifugación el pellet con espermatozoides selectos se ubica en el fondo del tubo en forma de pellet (C).

Fuente: propia.

#### **4.5. Cultivo *in vitro***

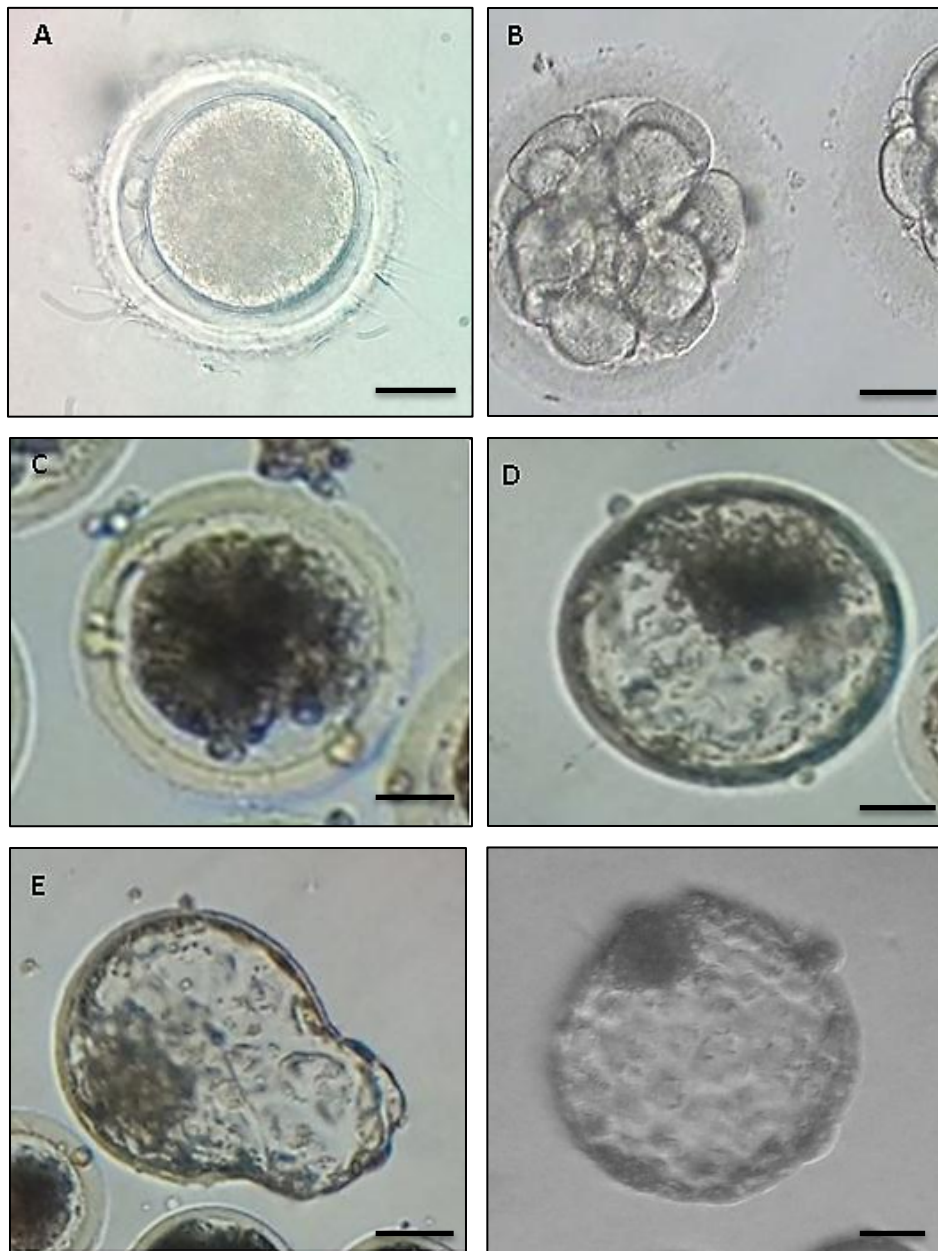
El medio de cultivo (Anexo 7) se preparó agregándole al medio SOF aminoácidos esenciales, no esenciales y mioinositol, para regular y favorecer el desarrollo del embrión. Luego de su preparación se colocó en forma de gotas cubiertas con aceite mineral en una placa de 30mm. En otra placa con 2 ml se colocó el mismo medio para lavar los presuntos cigotos; ambas placas se introdujeron 30 minutos a la incubadora antes del cultivo de los cigotos (óvulos fecundados).

Antes del cultivo, con ayuda de una pipeta Pasteur, se extrajeron las células del cúmulo a los presuntos cigotos; con cuidado de no romper la zona pelúcida. Esta extracción se realizó por que las células del cúmulo siguen dividiéndose y podrían evitar el normal desarrollo embrionario.

Pasado los 30 minutos, se lavaron a los cigotos y se cultivaron en una la placa con medio de cultivo en gotas. Pasados 3 días se realizó el cambio de medio que consistió en aspirar 30µl de medio y reponerle la misma cantidad con medio nuevo. El cultivo se mantuvo hasta el séptimo día y su eclosión hasta el noveno día.

Al final del séptimo día se evaluó el número de mórulas y blastocistos. Al noveno día se evaluó el número de embriones eclosionados.





### Figura 13. División embrionaria

En la figura se observa como los espermatozoides intentan fecundar al óvulo maduro (A), pasado la exposición con los espermatozoides se observa la segmentación de blastómeros al tercer día (B), mórula compacta (C) al quinto día, Blastocisto (D) al séptimo día, Blastocisto eclosionando (E), Blastocisto eclosionado (F) al noveno día. La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Fuente: propia.

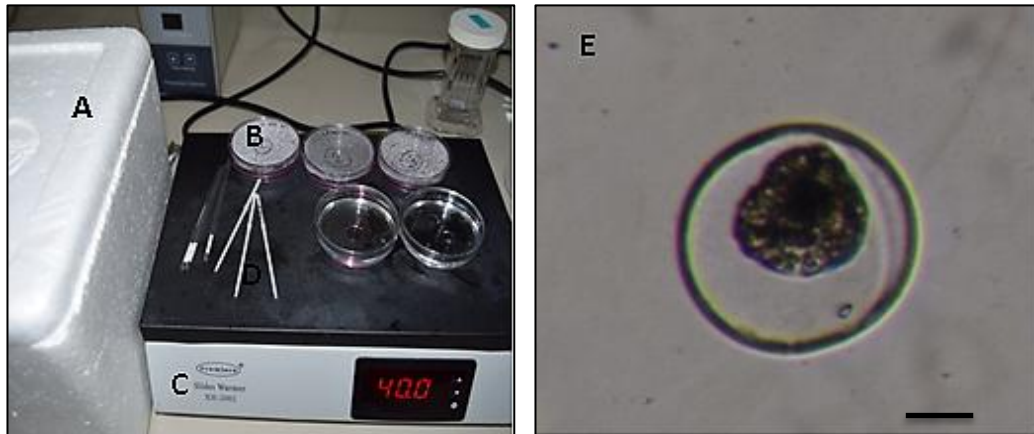
#### **4.6. Vitrificación de embriones**

El medio de mantenimiento (MM) utilizado para formular la solución de vitrificación y de calentamiento se preparó en medio TCM 199-Hepes con un 20% de SFB. Los blastocistos fueron transferidos a la solución de equilibrio (ES) compuesta por un 7,5% de etilenglicol (EG) y un 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) en MM durante 3 min. Luego, los blastocistos fueron sumergidos en solución de vitrificación (VS), conteniendo 15% de EG, 15% DMSO y 0,5 M de sacarosa disuelta en MM por 60 segundos. Los blastocistos se cargaron en el cryotop, y se sumergieron en nitrógeno líquido (Protocolo modificado Bao, 2011).

#### **4.7. Descongelamiento de los embriones**

El cryotop se sumergió directamente en la solución de calentamiento compuesta por 1 M sacarosa disuelta en TCM 199-Hepes con un 20% de SFB por 1 min. Inmediatamente los blastocistos se colocaron en la solución de dilución, que contenía 0,5 M de sacarosa disuelta en TCM 199-Hepes con 20% de SFB por 3 minutos (Protocolo modificado Bao, 2011).

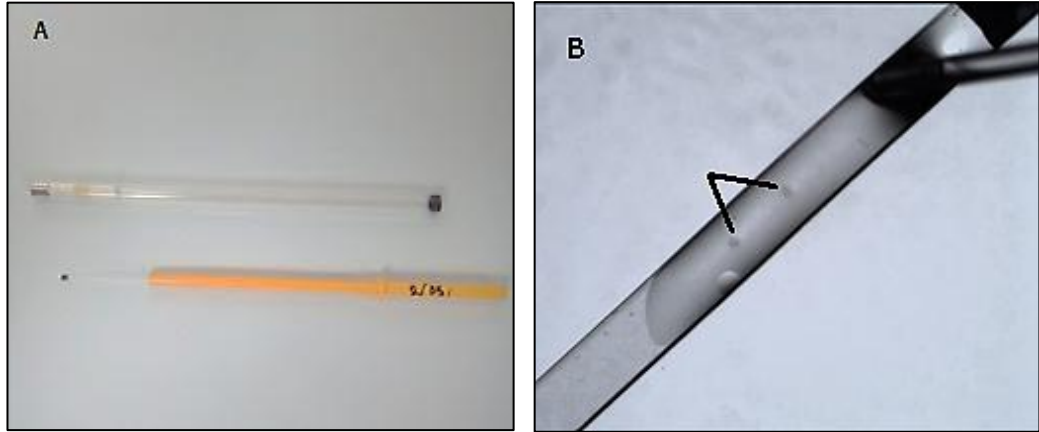
Los blastocistos fueron incubados en TCM 199-Hepes con 20% de SFB durante 5 minutos y finalmente transferidos al medio de cultivo SOF a 38,5 °C, a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y un 5% de O<sub>2</sub>. La supervivencia de los blastocistos se evaluó en función de la capacidad de re-expansión después de 24 horas de incubación (Protocolo modificado Bao, 2011).



#### **Figura 14. Vitricación de embriones**

En la figura se puede observar los materiales empleados para la vitricación de embriones como la caja de tecnopor (A) que contiene el nitrógeno líquido, la platina térmica (B), las placas Petri (C) conteniendo los medios de vitricación y los cryotop (D). Durante el proceso de vitricación se puede observar que el blastocisto está deshidratado (E) Materiales de vitricación, b. Blastocisto vitricado. La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Fuente: propia.



**Figura 15.** Empaque de vitrificación, Cryotop.

Se observa el empaque cryotop (A), compuesto por un mango y una fina lamina de propietileno donde son cargados los embriones (B) para su posterior vitrificación .

Fuente: propia.



**Figura 16. Blastocisto post vitrificación**

En la figura se observa al embrión expuesto al medio de vitrificación, donde se observa su deshidratación para evitar la formación de cristales de hielo. La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Fuente: propia.



**Figura 17. Ruptura de la membrana embrionaria post-vitrificación a las 24 horas**

Luego de descongelar el blastocisto, se observa ruptura de la zona pelúcida (A) y desprendimiento de la masa celular interna (B). La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Fuente: propia.

#### 4.8. Análisis de datos

Para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos según la categoría del óvulo, la distribución de los datos; condujo a una tabla de contingencia 2 x 2, conformada por dos filas y dos columnas, del cual genera un grado de libertad, lo que justifica la aplicación de la prueba exacta de Fisher a un  $\alpha = 0.05$ ., la prueba se realizó con el programa Minitab 2016.

##### 4.8.1. Tabla de resumen de resultados de la prueba exacta de Fisher

VARIABLE	PROBABILIDAD (P)	DECISIÓN/ OBSERVACIÓN
Maduración	0.553555 (Anexo 8)	Se acepta $H_0$ /Independencia
Segmentación	0.0493529 (Anexo 9)	Se rechaza $H_0$ /Dependencia
Blastocistos	0.459706 (Anexo 10)	Se acepta $H_0$ /Independencia
Eclosionados	0.311639 (Anexo 11)	Se acepta $H_0$ /Independencia

$H_0$ : Independencia entre las categorías y la variable

$H_0$ : Dependencia entre las categorías y la variable

$P > 0.05 \rightarrow$  Se acepta  $H_0$  (Independencia)

$P \leq 0.05 \rightarrow$  Se rechaza  $H_0$  (Dependencia)

## V. Resultados

En la Tabla 1 observamos el porcentaje de maduración alcanzando. Se consideró como maduros si los óvulos alcanzaron la metafase de la segunda división meiótica (porcentaje de óvulos con cúmulos expandido y presencia de corpúsculo polar). Este porcentaje de maduración *in vitro* para la categoría A y B fue de 90% y 84%, respectivamente, sin mostrar diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). Se observa también que un 10% y 16 % para ambas categorías respectivamente, no alcanzaron la maduración, esto debido a que los óvulos podrían tener una apariencia aceptable, sin embargo, se encuentran en etapa de degeneración.

A las 48 horas postfecundación se observó una tasa de división embrionaria o segmentación (óvulos fecundados que alcanzan el estadio de 2-4 células o más del total de óvulos) de 82% y 75% para la categoría A y B, respectivamente (Tabla 2), observando que existe efecto de la categoría del óvulo, sobre la tasa de segmentación ( $P \leq 0.05$ ).

A los siete días de cultivo, la tasa de embriones obtenidos (número de blastocistos obtenidos del total de óvulos) de la categoría A fue de 39% y de la categoría B fue de 36% (Tabla 3). De igual modo se observa un porcentaje de embriones degenerados, 61% y 64% respectivamente. No se observó diferencias significativas para este carácter ( $P > 0.05$ ). La Tabla 4 Indica que del total de embriones en estadio de blastocisto, el 97% y 93% llegaron a eclosionar el noveno día del cultivo, no existiendo diferencias significativas entre ambas categorías ( $P > 0.05$ ).

Finalmente, se realizó la vitrificación de embriones, donde no se logró obtener supervivencia de los embriones al momento del descongelamiento en ambas categorías. El 100% de los embriones descongelados mostraron ruptura de la zona pelúcida y desprendimiento de la masa celular interna; esto significa que el protocolo modificado no permitió la supervivencia de los embriones.



**Tabla 1.** Competencia meiótica según la categoría de óvulos

Categoría de óvulos	N° de óvulos	MII (%)	D (%)
A	50	45 (90%)	5 (10%)
B	50	42 (84%)	8 (16%)

Los óvulos previamente clasificados en dos categorías fueron madurados *in vitro* por 24 horas.

MII: metafase II (corresponde a óvulos maduros).

D: degenerados (contenido nuclear disperso o ausente en el citoplasma).

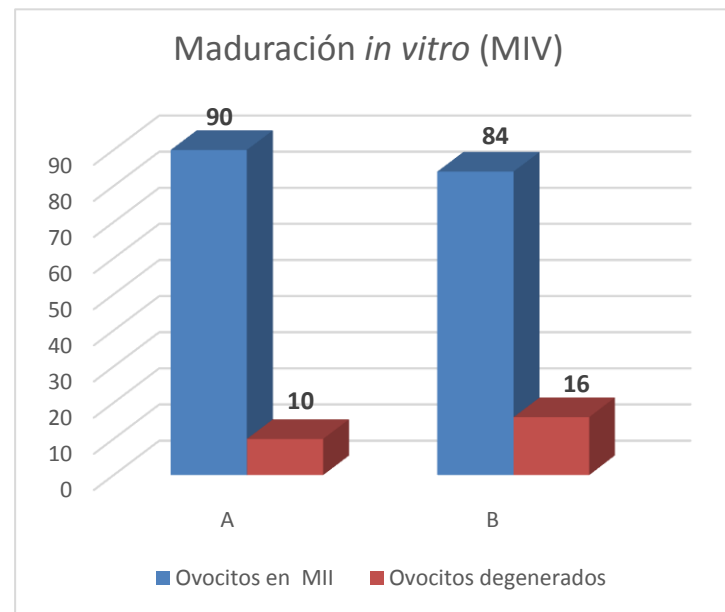


Figura 18. Porcentajes de maduración *in vitro* por categoría

**Tabla 2.** Segmentación embrionaria según categoría

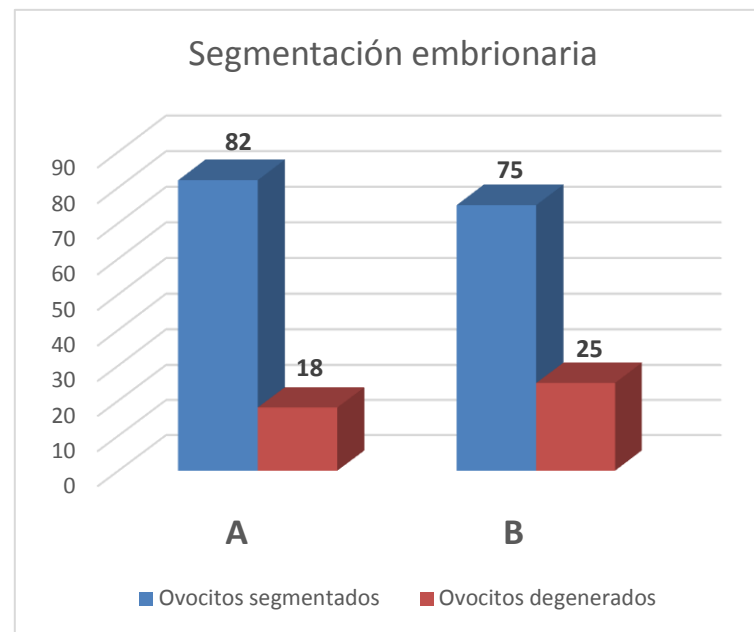
Categoría de óvulos	N° de óvulos	h	Seg (%)	D (%)
A	250	48	206 (82%) <sup>a</sup>	44 (18%) <sup>a</sup>
B	250	48	187 (75%) <sup>b</sup>	63 (25%) <sup>b</sup>

Los óvulos que alcanzaron la MII, fueron fecundados *in vitro* por 18 h. Luego fueron cultivados por 48 h, para evaluar la tasa de segmentación lograda.

Seg: segmentados (corresponde a los cigotos que fueron cultivados por 48 h y llegaron a dividirse hasta 2-4 o más células).

D: degenerados (división ausente o desprendimiento de blastómeros).

<sup>a,b</sup>: superíndice corresponde a diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 19.** Porcentaje de segmentación embrionaria postfecundación *in vitro* por categoría.

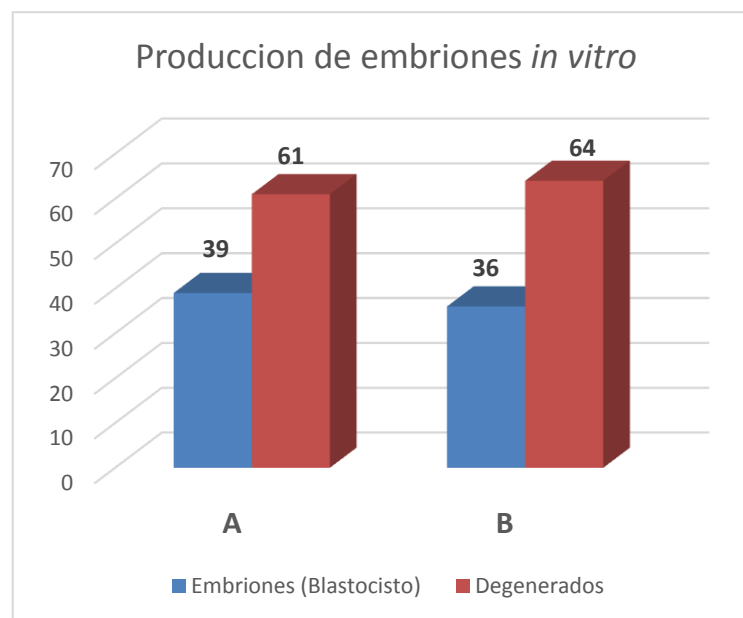
**Tabla N° 3** Porcentaje de embriones *in vitro*

Categoría de óvulos	N° de óvulos	d	B (%)	D (%)
A	250	7	98 (39%)	152 (61%)
B	250	7	89 (36%)	161 (64%)

Los cigotos fueron cultivados hasta el día (d) 7.

B: blastocisto obtenido (corresponde a los cigotos que alcanzaron al día 7 la categoría de blastocisto).

D: degenerados (blastómeros con coloración difusa o desprendida).



**Figura 20.** Desarrollo embrionario (Blastocistos) al séptimo día poscultivo por categoría de óvulos

**Tabla 4.** Eclosión de blastocistos.

Categoría de óvulos	N° de Embriones	Días CIV	Blastocisto Eclosionados	Blastocisto sin Eclosionar
A	93	9	90 (97%)	3 (3%)
B	84	9	78 (93%)	6 (7%)

Al noveno día de cultivo, se observa que la eclosión de los Blastocistos producidos no muestra diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) según la categoría del óvulo A y B.

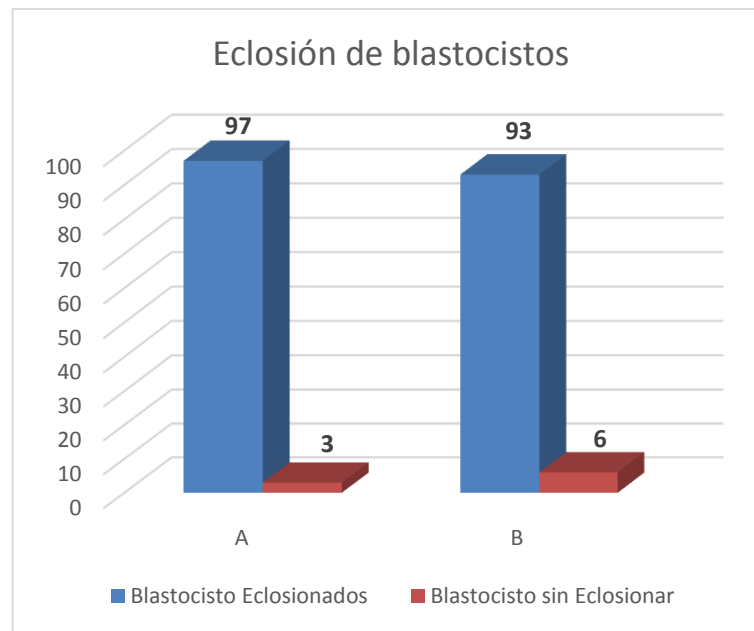


Figura 21. Desarrollo embrionario al noveno día (Blastocistos eclosionados) poscultivo por categoría de óvulos.

## VI. Discusión

El trabajo de investigación busca estandarizar un protocolo de PIV y criopreservación de embriones bovinos en el Laboratorio de Biotecnología Animal Reproducción y Mejoramiento Genético, de la Facultad de Ingeniería Zootecnista Agronegocios y Biotecnología.

Los óvulos seleccionados y clasificados en categoría A y B acorde a la clasificación propuesta por Liebfried y First, 1979, fueron madurados *in vitro*. En nuestro experimento, el porcentaje de maduración *in vitro* fue de 90% y 84% para la categoría A y B respectivamente, este valor es similar a los reportados por Knitlova *et al.*, 2017, entre otros. Por lo tanto, se deduce que tanto la maduración citoplasmática y nuclear se dieron durante las 24 horas de cultivo *in vitro*. Sin embargo, se observó que también existían óvulos degenerados que aparentaban estar en óptimas condiciones. La presencia de óvulos degenerados, podría deberse a la fase del ciclo estral, condición corporal o salud en el que se encontraban las hembras bovinas al momento del sacrificio (Hansen, 2006).

Otro grupo de óvulos madurados *in vitro*, fueron fecundados *in vitro* por 18 horas con espermatozoides previamente seleccionados y capacitados. Finalizada la fecundación los presuntos cigotos fueron cultivados por 48 horas. Luego de 48, se obtuvo una tasa de segmentación de 85 y 79% para las categorías A y B, respectivamente. Estos valores, demuestran que la calidad del óvulo influye sobre la tasa de segmentación de los embriones y sobre la competencia de desarrollo (Vasquez, *et al.*, 2015).

El cultivo embrionario prosiguió hasta el séptimo día. Al final del séptimo día, se obtuvo 39 y 36% de embriones producidos por categoría A y B; respectivamente, resultado similar a los obtenidos por otros autores (Mucci *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2007; Jácome y Guamantario, 2014). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre ambas categorías. Este resultado demuestra que la tasa de

segmentación no es determinante sobre la producción final de los embriones FIV y que las condiciones de cultivo durante los primeros días son relevantes para la continuidad de las segmentaciones (Crocco, 2011). Además, la detención de la segmentación en nuestro experimento podría deberse a factores externos al protocolo en sí; tales como los materiales usados, medios, entre otros. (Calado *et al.*, 200; Holm *et al.*, 1999; Rizos *et al.*, 2002). Además, se sabe que la influencia del medio de cultivo es muy importante durante la PIVE, obteniendo resultados que oscilan entre 30 y 40% (Marquant Le Guienne , *et al.*, 2001; Watanabe Y, *et al.*, 2001). Valores similares a los obtenidos en nuestro experimento para ambas categorías.

Estos resultados demuestran que el protocolo implementado y el uso de óvulos de categoría A y B son válidos para la utilización de la técnica PIVE en el Laboratorio de Biotecnología Animal Reproducción y Mejoramiento para el desarrollo de otras investigaciones.

En el experimento de criopreservación de embriones bovinos se utilizaron 20 blastocistos; donde el protocolo de criopreservación modificado de Bao, 2011, utilizado no permitió determinar las posibles diferencias entre las categorías de óvulos; ocasionando daños como la ruptura de la zona pelúcida, daño en la membrana citoplasmática, degeneración temprana, etc.

## VII. Conclusiones

Los óvulos de la categoría A, luego de las 48 horas postfecundación presentan mayor número de segmentación embrionaria.

No existen diferencias significativas (para las categorías A y B de los óvulos) en maduración *in vitro*, embriones producidos, ni eclosionados. Sin embargo, el protocolo empleado es apto para la producción *in vitro* de embriones.

El desarrollo embrionario se encuentra dentro de los reportados por diversos autores. Sin embargo, aún se requiere que las condiciones externas al protocolo como las artificiales sean mejoradas para lograr un aumento en la PIVE.

El protocolo de criopreservación propuesta en este trabajo aún necesita ser modificado. Se debe buscar un protocolo que favorezca los resultados de supervivencia.

## VIII. Recomendaciones

Los medios de cultivo utilizados para la producción de embriones deben contar con el pH y temperatura adecuada para la obtención de resultados provechosos, así como también los materiales a utilizar deben encontrarse en perfectas condiciones.

La correcta selección de los óvulos bovinos es fundamental; ya que esto influye en el éxito de la maduración *in vitro* y la posterior fecundación *in vitro*.

La metodología utilizada para la PIVE, debe presentar una correcta preparación de medios y la manipulación adecuada del óvulo y embrión.

La utilización del Cryotop en la criopreservación *in vitro* de embriones humanos, es provechosa para los embriones bovinos por su capacidad de enfriamiento rápido; por lo que se recomienda adecuar un protocolo para su utilización.

Los materiales y medios utilizados para la PIVE, deben encontrarse en condiciones óptimas y no utilizar material reciclado.



## IX. Referencias bibliográficas

- Abón , L. V. (2012). Calentamiento en paso unico de embriones bovinos producidos in vitro vitrificados. *Trabajo de fin de Máster.Universidad de Oviedo*, 38.
- Aerts , J., & Bols, P. (2010). Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Dom Anim*, 171-179.
- Ahumada, C. J. (Octubre de 2009). Efecto de diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre el desarrollo y la calidad de embriones de bovino producidos in vitro en grupos reducidos. *Universidad Politecnica de Valencia*, 43.
- Báez, F. J., Chávez, A. C., Hernández, H. J., & Villamediana, P. C. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica bos taurus y bos indicus. *Scielo*, v.20 n.3.
- Blondin, P. (2015). Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction*, 356-358.
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawck, W. J., Evans, J. F., & Dressel, M. A. (1982). Normal Development Following In Vitro Fertilization in the Cow. *Biology Of Reproduction*, 147-148.
- Calado A, Rocha E, Colaco, A., & Sousa, M. (2001). Stereologic characterization of bovine (Bos taurus) cumulus-oocyte complexes aspirated from small antral follicles during the diestrous phase. *Biol. Reprod*, 1383-1391.
- Crocco. (2011). Suero en el medio de cultivo: actividad celular de embriones mantenidos in vitro en estadios iniciales de clivaje. *Biblioteca digital FCEN-UBA*, 50-62.
- Denis , R. (2008). ASPIRACIÓN FOLICULAR IN VIVO (OPU) UNA NUEVA PERSPECTIVA EN EL CAMPO DE LAS BIOTECNOLOGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN . *Ciencia y tecnologia Ganadera*, 57-70.
- Eichenlaub-Ritter, & Peschke. (2002). Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update*, 21-41.
- Eisenbach, & Giojolas. (2006). Sperm guidance in mammals an unpaved road to the egg. *Molecular cell biology*, 276-281.
- Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción In vitro de embriones bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias - Reproduccion Animal*, 51-60.
- Filipak, Y., & Larocca, C. (2010). *Manual de fertilización in vitro en bovinos*. Montevideo.

- Giraldo, J. J. (2012). Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista Lasallista de investigacion*, 13-20.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Ireland: CABli Publishing.
- Hansen, P. J. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle—an overview. *Theriogenology*, 119-125.
- Heikinheimo, & Gibbons. (1998). The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol. Hum. Reprod.*, 745-756.
- Hernández, H. (2005). Fecundación in vitro. En H. Hernández, *Manual de ganadería de doble propósito* (pág. 615). Venezuela.
- Herradón, P. G., Quintela, L. A., Becerra, J. J., Ruibal, S., & Fernández, S. (2007). Fecundación In Vitro: Alternativa para la Mejora Genética en bovinos. *Producción Animal*, 33-40.
- Hidalgo, Tamargo, & Díez. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecnología agroalimentaria*, 39-43.
- Holm, P., Booth, P., & Schmidt, M. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOF, a medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 683-700.
- Hoon , T. L., Gupta, M. K., & Lee, H. L. (2010). Cryopreservation of Oocytes and Embryos by Vitrification. *Reprod.Med*, 267-291.
- IETS. (2015). Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals . <http://www.iets.org/>, 1-16.
- Jácome Aymara, M. A., & Guamantario Tuba , M. (2014). Evaluación de producción in vitro de embriones de bovinos (bos taurus) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la universidad técnica de cotopasi. *Unidad de ciencias agropecuarias y recursos naturales*, 50-58.
- Knitlova, Hulinska, & Jeset. (2017). Supplementation of l-carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology*, 16-22.
- Kuwayama, M., Vajta, G., Leda, S., & Kato, O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod.Biomed*, 608-614.
- Liebfried, & First. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Anim Sci.*, 79-86.
- Mahi, C. A., & Yanagimachi, R. (1976). Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *Reproductive Biology*, 189–195.

- Marquant Le Guienne , B., Guyader Joly, C., Ponchon, S., & Delalleau, N. (2001). Results of in vitro production in a commercial ovum pick-up program. *Theriogenology*, 433-440.
- MINAGRI. (02 Junio 2017.). Perú va camino a superar el nivel actual de consumo de leche por persona. <http://www.minagri.gob.pe/portal/publicaciones-y-prensa/noticias-2017/19322>, 1-2.
- Moniruzzaman, & Miyano. (2010). Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 559-566.
- Moore. (2007). Embriología Clínica. *Elseiver*, 44.
- Mucci N, Haller J., & Kaiser G. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación. *Arch. Med. Vet.* 38, Nº 2, 97-104.
- Nagano, M., Takahashi, Y., & Katagiri, S. (1999). In Vitro Fertilization an cortical granule distribution of bovine oocyte having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *Journal of veterinary medical*, 531-535.
- Otero. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistema casa y citometría de flujo: identificación de sub poblaciones espermáticas. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.*
- Pahuara, L. E., & Naveros, M. (2014 ). Producción in vitro de embriones bovinos (*Bos taurus*) en dos medios de cultivo. *Spermova*, 54-57.
- Ramírez , O., & Bernal, S. (2012). Vitricación de embriones bovinos . *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 419-429.
- Rizos, D., Duffy, P., Ward, F., Boland, M., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, 234-248.
- Robaire , Hinton, & Orgebin-Crist. (2006). The epididymis. *In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 1071-1148.
- Sato, Matsuo, & Miyamoto. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5' monophosphate. *J Anim Sci*, 1182-1187.
- Sawyer , H., Smith, P., Heath , D., Juengel , J., Wakefield, S., & McNatty , K. (2002). Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod.* 66: 1134 –1150, 1134-1150.
- Segura, G. T. (2015). Capacidad de maduración in vitro de ovocitos obtenidos de folículos de tres tamaños diferentes en bovinos. *Spermova* , 106-109.

- Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P. B., y otros. (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*, 904-909.
- Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P. B., y otros. (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocyte before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of reproduction* , 904-909.
- Van Den Hurk , & Zhao. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. . *Theriogenology*, 1717-1751.
- Vasquez , Hamdi , & Maillo. (2015). Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* , 621-629.
- Wassarman. (1990). Profile of a mammalian sperm receptor. *Development for advances in developmental biology and stem cells*, 1-17.
- Watanabe Y, Dayan, A., Meirelles, F., & Watanabe, M. (2001). Pre and post implantation development of IVP bovine embryos. *Theriogenology*, 441-448.
- Young, & McNeilly. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, 489-504.
- Younis , A. I., Brackett, B. G., & Fayrer- Hosken, R. (1990). Influence of serum and hormones on bovine. *Gamete*, 189-201.

## X. Anexos

### Anexo 1. Medio de transporte de ovarios

SOLUCION SALINA	
COMPONENTES	CANTIDAD
NaCl	9.5 gr
Agua destilada	1 litro
Gentamicina	10 mg

### Anexo 2. Medio de búsqueda y lavado de óvulos

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

**Llevar la solución a autoclave y refrigerar**

### STOCK

STOCK	
COMPONENTES	CANTIDAD
LH	0.05 UI/ml
FSH	0.05 UI/ml
HMG	0.004 UI/ml
PVA	1 gr
Myoinositol	0.04 mg/ml

### Anexo 3. Medio de maduración *in vitro*

MEDIO DE MADURACIÓN PARA 2ml	
TCM-199	1.8 ml
SFB	200 µl
PIRUVATO	50 µl
FSH	50 µl
LH	50 µl
HMG	50 µl

#### **Anexo 4. Medio de selección espermática**

Percoll al 100% para 45ml	
Percoll 100%	40.5 ml
PBS 10x	4.5 ml

Percoll al 90% para 50ml	
Percoll 100%	45 ml
PBS 1X	5 ml

Percoll al 45% para 50ml	
Percoll 90%	22.5 ml
PBS 1X	27.5 ml

#### **Anexo 5. Medio de capacitación espermática**

Medio de capacitación espermática 10ml	
SOF base	3 ml
Heparina	24 $\mu$ l

### Anexo 6. Medio de fecundación *in vitro* espermática (SOF)

Aditivos SOF base 50ml	
NACL	3.147 mg
KCL	26.7 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.1 mg
NAHCO <sub>3</sub>	105.3 mg
CACLO <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	9 mg
MGCL <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	4.98 mg
NA-PIRUVATO	1.65 mg
NA-LACTATO	23.5 µl
L- GLUTAMINA	7.3 mg
KANAMICINA	4 mg
ROJO FENOL	0.1mg
BSA	150 mg

### Anexo 7. Medio de cultivo *in vitro*

Medio de cultivo <i>in vitro</i> 25 ml	
SOF base	25 ml
Aminoácidos esenciales	20 µl
Aminoácidos no esenciales	20 µl
Myoinositol	20 µl



### Anexo 8. Estadísticas tabuladas: CATEGORÍA, MADURACIÓN

Usando frecuencias en FRECUENCIA

Filas: CATEGORIA Columnas: MADURACIÓN

	1	2	Todo
1	5	45	50
	10	90	100
	38.46	51.72	50.00
2	8	42	50
	16	84	100
	61.54	48.28	50.00
Todo	13	87	100
	13	87	100
	100.00	100.00	100.00

Contenido de la celda:   Conteo   % de la fila   % de columna

**Prueba exacta de Fisher: Valor P = 0.553555**

**Anexo 9. Estadísticas tabuladas: CATEGORIA, SEGMENTADOS**

Usando frecuencias en FRECUENCIA

Filas: CATEGORIA Columnas: SEGMENTADOS

	1	2	Todo
1	44	206	250
	17.60	82.40	100.00
	41.12	52.42	50.00
2	63	187	250
	25.20	74.80	100.00
	58.88	47.58	50.00
Todo	107	393	500
	21.40	78.60	100.00
	100.00	100.00	100.00

Contenido de la celda:    Conteo        % de la fila        % de columna

**Prueba exacta de Fisher: Valor P = 0.0493529**

## Anexo 10. Estadísticas tabuladas: CATEGORIA, BLASTOCISTOS

Usando frecuencias en FRECUENCIA

Filas: CATEGORIA Columnas: BLASTOCISTOS

	1	2	Todo
1	152	98	250
	60.80	39.20	100.00
	48.56	52.41	50.00
2	161	89	250
	64.40	35.60	100.00
	51.44	47.59	50.00
Todo	313	187	500
	62.60	37.40	100.00
	100.00	100.00	100.00

Contenido de la celda:    Conteo    % de la fila    % de columna

**Prueba exacta de Fisher: Valor P = 0.459706**

**Anexo 11. Estadísticas tabuladas: CATEGORIA, ECLOSIONADOS**

Usando frecuencias en FRECUENCIA

Filas: CATEGORIA Columnas: ECLOSIONADOS

	1	2	Todo
1	3	90	93
	3.23	96.77	100.00
	33.33	53.57	52.54
2	6	78	84
	7.14	92.86	100.00
	66.67	46.43	47.46
Todo	9	168	177
	5.08	94.92	100.00
	100.00	100.00	100.00

Contenido de la celda: Conteo % de la fila % de columna

**Prueba exacta de Fisher: Valor P = 0.311639**

**Anexo 12. Panel fotográfico.**



**Análisis de viabilidad de semen en el BSE**



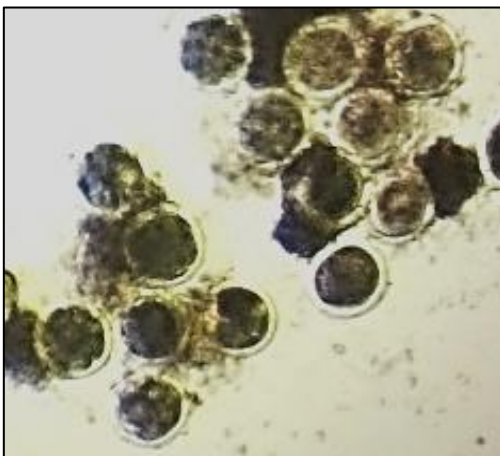
**Tinción de eosina-nigrosina**



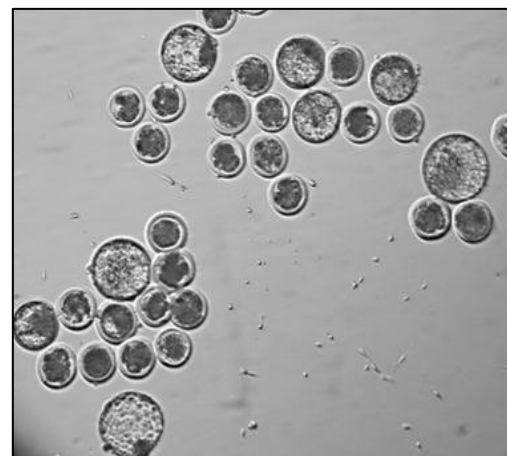
**Búsqueda de óvulos**



**Maduración *in vitro* de óvulos a las 24 horas**



**División embrionaria a las 24 horas**



**Producción de embriones *in vitro***