



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



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* Y TASA DE
CONCEPCIÓN A PARTIR DE OVOCITOS BOVINOS
VITRIFICADOS Y FERTILIZADOS *IN VITRO*”**

Autor:

Bach. Yander Mavila Briceño Mendoza

Asesor:

PhD. Ilse Silvia Cayo Colca

Co-asesor:

Dr. José Antonio Mantilla Guerra

Registro:

CHACHAPOYAS – PERÚ

2018

DEDICATORIA

A mi padre Aurelio Briceño Oxolón por su apoyo brindado para seguir adelante con mi formación académica y profesional. A ti, madre querida Rudecinda Mendoza Ventura, por tus consejos, por la motivación y el amor brindado. A mis hermanos Gilmer y Alfredo, mi cuñada Noemi y mis sobrinas Kristell y Kimberly luces de mi vida a quienes amo con todo el corazón; mi inspiración y alegría para luchar por mis sueños.

“El futuro pertenece a aquellos que creen en la belleza de sus sueños”.

- Eleanor Roosevelt

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de becas del Ministerio de Educación (MINEDU) en co-financiamiento con el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y CIENCIACTIVA por fomentar nuestro espíritu investigador y de innovación con la finalidad de contribuir en el mejoramiento de la producción de nuestras regiones y el país.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A) bajo la dirección del rector Ph.D Jorge Luis Maicelo Quintan por brindarnos las facilidades de continuar nuestros estudios de especialización en esta prestigiosa casa de estudios.

Al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología (IGBI) y al Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento genético por abrirme las puertas para la ejecución de esta investigación.

A mi asesora de tesis y amiga Ph.D Ilse Silvia Cayo Colca por su apoyo, enseñanzas y su confianza en mí ha aportado grandemente en mi desarrollo personal y profesional.

Al MV. Edwin Vásquez Vásquez responsable del Centro de beneficio de Bagua Grande quien me brindó todas las facilidades de colección de muestras en dicho establecimiento y ayuda sin la cual no hubiese sido posible la ejecución de esta investigación.

Al MV. Luis Nilton Murga Valderrama por su apoyo en la fase de campo de esta investigación, por su dedicación y enseñanza. Y a todos los docentes de la UNTRM-A que me brindaron sus conocimientos y experiencias.

A todos y cada uno de mis compañeros de la maestría, los cuales me brindaron su apoyo incondicional durante estos dos años, por las experiencias vividas y la amistad compartida.

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

**DR. POLICARPIO CHAUCA VALQUI
RECTOR**

**DR. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN
VICERRECTOR ACADÉMICO**

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

**Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO**

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS

Yo, **Ilse Silvia Cayo Colca**, Doctoris Phylosophae, identificada con DNI N° 09820879, docente de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Doy VISTO BUENO, al informe de tesis titulado: **“DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO* Y TASA DE CONCEPCIÓN A PARTIR DE OVOCITOS BOVINOS VITRIFICADOS Y FERTILIZADOS *IN VITRO*”** elaborado por la Bach. Yander Mavila Briceño Mendoza, para optar el grado de Maestro en Producción Animal.

Por lo tanto:

Para mayor constancia y validez firmo el presente.

Chachapoyas, 26 marzo del 2018

PhD. Ilse Silvia Cayo Colca

Asesora

JURADO EVALUADOR

Mg. Julio Mariano Chávez Milla
PRESIDENTE

Mg. Erick Aldo Auquiñivin Silva
SECRETARIO

Mg. Segundo José Zamora Huamán
VOCAL

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD	iv
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS	v
JURADO EVALUADOR.....	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
2.1. Ubicación del estudio.....	4
2.2. Procedimiento para trabajo en laboratorio	4
2.2.1. Transporte de ovarios.....	4
2.2.2. Obtención y selección de los ovocitos.....	4
2.2.3. Maduración <i>in vitro</i>	6
2.2.4. Evaluación del estadio nuclear	6
2.2.5. Vitricación y descongelamiento de ovocitos.....	6
2.2.6. Fertilización <i>in vitro</i>	7
2.2.7. Selección y capacitación espermática.....	7
2.2.8. Cultivo <i>in vitro</i>	8
2.2.9. Clasificación de embriones.....	8
2.3. Procedimiento para trabajo en campo	9
2.3.1. Evaluación y selección de receptoras	9
2.3.2. Sincronización de celo de receptoras.....	9
2.3.3. Transferencia de embriones.....	9
2.3.4. Diagnóstico de concepción.....	9
2.4. Análisis de datos.....	10
III. RESULTADOS	11
3.1. Estadio nuclear de los complejos cúmulos - ovocitos (COC's).....	11
3.2. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	15

3.3. Tasa de concepción	18
IV. DISCUSIÓN	21
V. CONCLUSIONES	23
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de embriones, según estado de desarrollo y calidad.....	8
Tabla 2. Estadío nuclear de los COC´s post 24 horas de maduración <i>in vitro</i>	12
Tabla 3. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> post 7 días de cultivo	16
Tabla 4. Tasa de concepción.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Categorización de ovocitos.....	5
Figura 2. Técnica de gradientes de Percoll	7
Figura 3. Estadio nuclear de los COC´s posterior a 24 horas de maduración <i>in vitro</i>	12
Figura 4. Observación de los COC´s luego de 24 horas de maduración <i>in vitro</i>	13
Figura 5. Determinación del estadio nuclear de los COC´s con aceto – orceína	14
Figura 6. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> post 7 días de cultivo.....	16
Figura 7. Embriones producidos <i>in vitro</i> a partir de ovocitos vitrificados.....	17
Figura 8. Concepción de embriones producidos a partir de ovocitos bovinos	19
Figura 9. Ecografía a los 35 días pos transferencia embrionaria.....	20

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de flujo de la investigación	29
Anexo 2. Solución salina.....	30
Anexo 3 Medio de manipulación	30
Anexo 4. Medio de maduración.	30
Anexo 5. Medio base para vitrificación	30
Anexo 6. Medio equilibrante para vitrificación	31
Anexo 7. Medio de vitrificación.....	31
Anexo 8. Medio de descongelamiento	31
Anexo 9. Medio de dilución.....	31
Anexo 10. Medio de Talp FIV (Fertilización)	31
Anexo 11. Aditivos para el medio de fertilización.....	32
Anexo 12. Medio base para percoll (SP-TL- 10X)	32
Anexo 13. Medio de Percoll al 90%.....	32
Anexo 14. Medio SP-TL para percoll de 45%	32
Anexo 15. Medio de cultivo de Fluido Oviductal Sintético (SOF).....	33
Anexo 16. Aditivos para el medio SOF	33
Anexo 17. Identificación y evaluación de vacas receptoras.....	34
Anexo 18. Protocolo de sincronización.....	35
Anexo 19. Tabla de contingencia para evaluación del grupo de mórulas	35
Anexo 20. Pruebas de chi-cuadrado para el grupo de mórulas	35
Anexo 21. Tabla de contingencia para evaluación del grupo de blastocistos	36
Anexo 22. Pruebas de chi-cuadrado para el grupo de blastocistos	36
Anexo 23. Selección de donadoras y colección de muestras.	37
Anexo 24. Aspiración folicular, búsqueda y selección de COC's.	37
Anexo 25. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	37
Anexo 26. Cryotop para la criopreservación de ovocitos	38
Anexo 27. Selección y capacitación espermática.....	38
Anexo 28. Cultivo <i>in vitro</i>	38
Anexo 29. Materiales utilizados para la sincronización de receptoras.....	39
Anexo 30. Diagnóstico de concepción.	39

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el desarrollo de embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos bovinos (*Bos indicus*) vitrificados en estadio maduro. Los ovarios fueron colectados del Centro de Beneficio Municipal de Bagua Grande, provincia de Utcubamba, desde agosto del 2017 a enero del 2018. Para ello se seleccionaron vacas Brahman como donadoras de ovarios. Los ovarios colectados fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas en la Ciudad de Chachapoyas, provincia de Chachapoyas para aspirar los ovocitos de los folículos, madurarlos *in vitro* y vitrificarlos. Se determinó el estadio de nuclear de los ovocitos, con aceto orceína. Se observó que el 12.5% estaba en estadio de vesícula germinal, 5% en metafase I (MI) y 82.5% en metafase II (MII). Luego de la fecundación *in vitro*, el potencial de desarrollo embrionario fue evaluado al séptimo día de cultivo *in vitro* obteniendo del grupo experimental (ovocitos vitrificados) 5.8% y 10.4% de mórulas y blastocistos, respectivamente; y un 11.6% y 24.9% de mórulas y blastocistos del grupo control (sin proceso de vitrificación). Paralelamente se realizó la evaluación y sincronización de vacas receptoras en el centro poblado de Chontapampa, distrito de Quinjalca, provincia de Chachapoyas. Un grupo de 14 embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos vitrificados fueron transferidos en fresco y se determinó la tasa de concepción por ecografía trasnrectal 35 días posterior a la transferencia obteniendo un 24.1% de preñeces.

Palabras clave: Vitrificación, metafase II, cryotop, blastocistos, mórulas, preñez.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the development of embryos produced *in vitro* from bovine (*Bos indicus*) oocytes vitrified in mature stage. The ovaries were collected from the Municipal Benefit Center of Bagua Grande, province of Utcubamba, from August 2017 to January 2018. For this purpose, Brahman cows were selected as ovarian donors. The collected ovaries were transferred to the Laboratory of Animal Biotechnology, Reproduction and Genetic Improvement of the Toribio Rodríguez de Mendoza National University of Amazonas in Chachapoyas city, province of Chachapoyas to aspirate the oocytes from the follicles, ripen them *in vitro* and vitrify them. The nuclear stage of the oocytes was determined, with acetoacetic acid. It was observed that 12.5% were in germinal vesicle stage, 5% in metaphase I (MI) and 82.5% in metaphase II (MII). After *in vitro* fertilization, the embryonic development potential was evaluated on the seventh day of *in vitro* culture, obtaining 5.8% and 10.4% of morulas and blastocysts from the experimental group (vitrified oocytes), respectively; and 11.6% and 24.9% of morulas and blastocysts of the control group (without the vitrification process). At the same time, the evaluation and synchronization of recipient cows was carried out in Chontapampa, district of Quinjalca, province of Chachapoyas. A group of 14 embryos produced *in vitro* from vitrified oocytes were transferred fresh and the conception rate was determined by transrectal ultrasound 35 days after the transfer, obtaining 24.1% of pregnancies.

Key words: Vitrification, metaphase II, cryotop, blastocysts, morulas, pregnancy

I. INTRODUCCIÓN

El ovario es el órgano principal en la reproducción de la hembra, el cual cumple funciones y producción de hormonas encargadas de la regulación del ciclo estral y la gestación como son los estrógenos y la progesterona. Los ovarios en los bovinos están situados en las proximidades de la región pelviana caudalmente a los riñones y son de forma ovoide (Quintela *et al.*, 2006).

Los ovarios constan de la médula, la corteza envuelta por la túnica albugínea y el epitelio superficial o germinal. La médula es la parte central del ovario y está conformada por tejido conectivo, fibras nerviosas, vasos arteriales, venosos y linfáticos; la corteza contiene pequeñas cavidades llamadas folículos, los cuales se encuentran en diferentes fases de desarrollo (primarios, secundarios, antrales, atrésicos, entre otros). En epitelio superficial o germinal es donde se forman las células germinales en la etapa embrional (Bautista *et al.*, 2015).

Durante el tercio medio de la gestación el ovario del feto se encuentra saturado de ovogonias los cuales se convertirán en ovocitos, éstos se encuentran almacenados en folículos primordiales preantrales. Gran parte de los ovocitos se inactivan durante la mitad de la vida fetal, naciendo el animal con un número determinado de ovocitos recluidos dentro de su respectivo folículo (Palma, 2001).

Existen alrededor de 0.5 millones de folículos en los ovarios bovinos, los cuales gradualmente abandonaran su estado de latencia e iniciaran su desarrollo a folículos antrales durante la pubertad; existe una amplia variación entre la llegada a esta etapa entre los *Bos taurus* y *Bos indicus* los cuales van entre los siete y diez meses en los primeros y los catorce y veinticuatro meses en los segundos (Castro, 1984).

Durante la pubertad el folículo ovárico bovino crece unas 300 veces en diámetro desde el estadio de folículo primario (50µm) hasta el estadio preovulatorio (15mm) (Lussier *et al.*, 1987; Webb *et al.*, 2004). Luego inician su maduración por la acción de picos hormonales, este proceso es conocido como foliculogénesis.

Durante la foliculogénesis hay crecimiento de un grupo de ovocitos pero sólo uno logra prosperar y ser ovulado, siendo los demás atresiadados representando un problema ya que éstos ovocitos podrían ser utilizados (Bautista *et al.*, 2015).

En la actualidad, existen métodos de conservación de material genético tales como la refrigeración, congelación lenta, congelación rápida, ultracongelación o liofilización. Investigaciones referidas a la criopreservación de ovocitos bovinos han aumentado en los últimos años, ya que representaría una alternativa para la creación de bancos genéticos (Dinnyés *et al.*, 2014).

Existen diversas metodologías empleadas para la criopreservación de material biológico; una de las alternativas es la vitrificación, el cual es un método de crioconservación ultrarrápida que permite congelar ovocitos disminuyendo la formación de cristales de hielo los cuales causan daño dentro del ovocito; sin embargo, sus efectos tóxicos por el uso de altas concentraciones de crioprotectores en la solución sigue siendo un problema (Pugh *et al.*, 2000).

Por lo tanto, los protocolos de congelación utilizan una combinación de deshidratación, depresión del punto de congelación, sobreenfriamiento en un intento de evitar daños de células (Saragusty & Arav, 2011). Por lo tanto, es importante utilizar crioprotectores, tal como dimetil sulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG), o glicerol (G) solos o en combinación.

De igual modo las bajas temperaturas provocan varias alteraciones citológicas y bioquímicas, como ruptura de membranas, falla en la extrusión del corpúsculo polar, fragmentación del ADN, fractura de la zona pelúcida, deshidratación y pérdida de función de proteínas (Men *et al.* 2003).

Todos estos problemas hacen que la crioconservación de ovocitos bovinos siga siendo un reto significativo y dado que existe un creciente interés en la posibilidad de obtener embriones a partir de ovocitos criopreservados para la aplicación de las nuevas tecnologías,

la investigación referente al tema se ha convertido en una prioridad (Martins, 2004). Técnicas como las tinciones con fluorocromos ayudan tener una idea de la viabilidad del ovocito y el éxito de un protocolo de congelamiento; por otro lado, la fertilización *in vitro* es una técnica recientemente desarrollada en el país siendo útil para estudiar eventos celulares y moleculares involucrados en la interacción gamética, la fecundación y desarrollo embrionario temprano. Por lo cual, resulta ser un método efectivo para determinar la capacidad de desarrollo de un óvulo vitrificado y descongelado.

El primer éxito de fertilización *in vitro* (FIV) utilizando ovocitos de ratón congelados-descongelados fueron informados por Parkening *et al.*, 1976 y Leibo *et al.*, 1978, obteniendo bajas tasas de fecundación; en un principio esto se asoció con lesiones de refrigeración y congelación, incluyendo el endurecimiento de la zona pelúcida debido a la liberación prematura de los gránulos corticales (Fuku, Xia, & Downey, 1995) y la desorganización del husillo y la pérdida de microtúbulos (Aman & Parks, 1994).

A partir de éstas investigaciones se empezó a desarrollar protocolos para la vitrificación de ovocitos en especies domésticas; pero informes relacionados al éxito de preñeces a partir de ovocitos bovinos congelados - descongelados son muy escasas. El fracaso en la tasa de preñez se debe a que los óvulos poseen alto contenido de lípidos citoplasmáticos que hacen que estas células sean muy sensibles al frío, dando como resultado degeneración de la célula.

Por lo tanto, el objetivo general de este estudio fue evaluar la capacidad de desarrollo embrionario y tasas de concepción de ovocitos bovinos vitrificados y fertilizados *in vitro*. Para lo cual se planteó como objetivos específicos:

- i. Determinar el estadio nuclear del ovocito bovino antes del proceso de vitrificación.
- ii. Determinar la capacidad de desarrollo embrionario a partir de la tasa de división celular y producción de embriones *in vitro* de ovocitos bovinos vitrificados.
- iii. Determinar las tasas de concepción *in vivo* por ecografía a los 21 días post transferencia embrionaria.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del estudio

La recolección de muestras se llevó a cabo en el Centro de Beneficio Municipal de Bagua Grande, ubicado en el Jr. Mesones Muro cuadra 1 de la ciudad de Bagua Grande, provincia de Utcubamba, región Amazonas. El periodo de recolección fue de agosto del 2017 a enero del 2018.

El procesamiento de la muestra (criopreservación y fertilización *in vitro*) se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, situado en el Barrio Higos Urco s/n de la Ciudad de Chachapoyas, provincia de Chachapoyas, región Amazonas.

El trabajo de campo (sincronización de vacas, transferencia de embriones y diagnóstico de preñez) se realizó en el centro poblado de Chontapampa, distrito de Quinjalca, provincia de Chachapoyas.

2.2. Procedimiento para trabajo en laboratorio

2.2.1. Transporte de ovarios.

Los ovarios se transportaron del centro de beneficio de Bagua Grande-Amazonas al Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, en un recipiente isotérmico conteniendo cloruro de sodio al 0.9% (wt/vol) con 0.025 mg/mL de estreptomina, temperado a 37°C (Anexo 2).

2.2.2. Obtención y selección de los ovocitos

Los complejos cúmulos ovocitos (COC's) se aspiraron de folículos de 2-7mm con una jeringa de 10mL y una aguja de 18G 1 ½". La selección de los COCs, se realizó utilizando la clasificación de Liebfried y First, (1979); la cual describe a los ovocitos del tipo A, como un ovocito con células del cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo; el tipo B tiene capas múltiples del cumulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el

tipo C se caracteriza por poseer un cumulus denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras; el tipo D tiene un cumulus con células expandidas y un citoplasma irregular con zonas oscuras.

Para la investigación los COC's se seleccionaron y lavaron en medio de manipulación (Anexo 3) usando un estereoscopio y sólo los ovocitos de clasificación A y B fueron utilizados para el proceso de maduración.

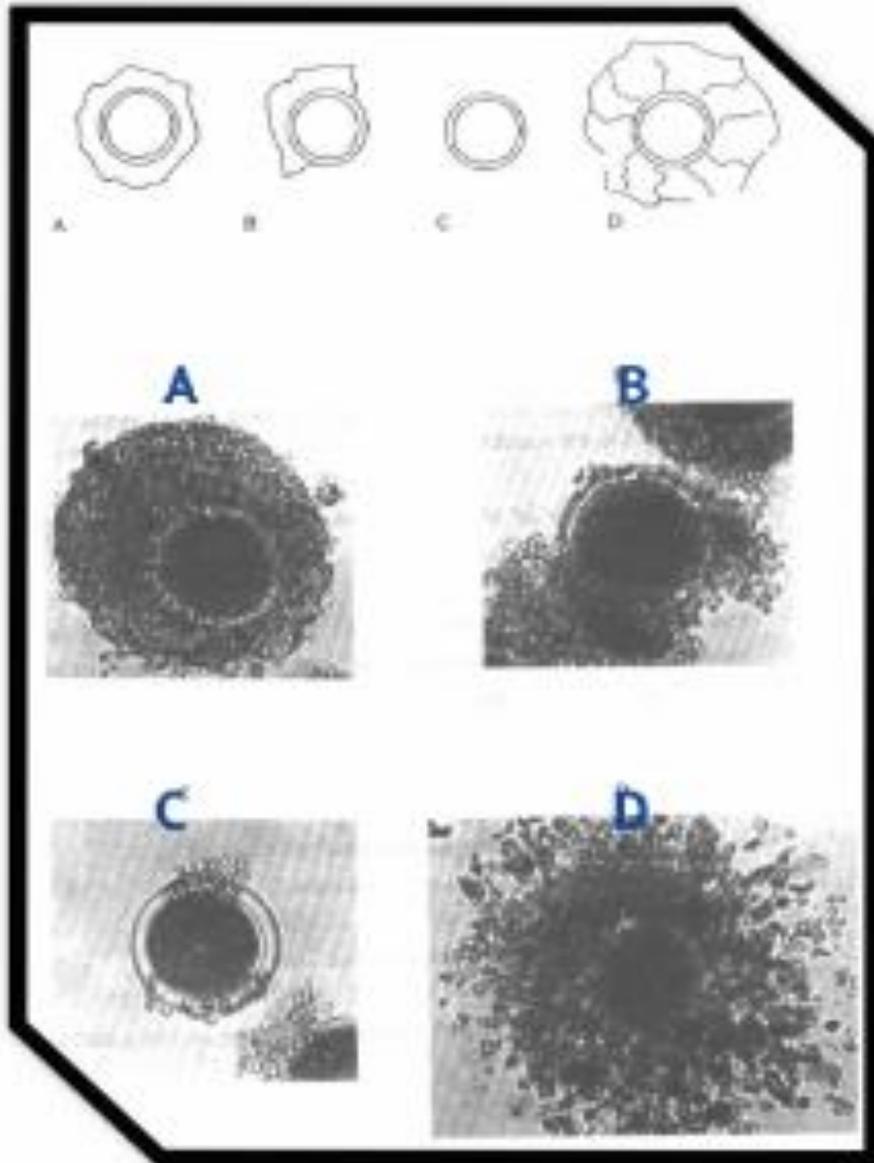


Figura 1. Categorización de los complejos cúmulo-ovocitos (COC's) (Liebfried y First, 1979).

2.2.3. Maduración *in vitro*

Los COC's de las categorías A y B se cultivaron en grupos de 20, en gotas cubiertas con aceite mineral durante 22 horas a una temperatura de 38.5°C y 6% de CO₂, con aire saturado de humedad en medio de maduración (Anexo 4). TCM-199 suplementado con 0.1 mg/mL de L-Glutamina, 0.25 mg/mL de piruvato de sodio, 0.01U/mL de Hormona Folículo Estimulante (FSH), 0.01U/mL de Hormona Luteizante (LH), 50µg/mL de gentamicina, 1µg/mL de 17β estradiol y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB). Luego fueron vitrificados con la metodología que se describe líneas abajo.

2.2.4. Evaluación del estadio nuclear

La estructura nuclear se evaluó con un microscopio binocular (Olympus, Japón) previa fijación de los ovocitos en láminas portaobjeto con ácido acético-etanol (1:3, vol/vol) y teñidos con 1% de aceto-orceina (wt/vol), según lo reportado por Hirao *et al.*, (1995); Motlik y Fulka (1976).

2.2.5. Vitrificación y descongelamiento de ovocitos

Los COC's fueron sumergidos en una solución equilibrante (SE; Anexo 6) por 3 minutos. La SE consistió en 7,5% de Etileno Glicol (EG) y 7.5% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) en solución base (SB). La SB estuvo compuesta por TCM-199 HEPES y 20% de SFB (Anexo 5). Posteriormente, los COC's fueron expuestos por 1 minuto a la solución de vitrificación (SV; Anexo 7), que consistió en 15% de EG, 15% de DMSO y 0.5M de sucrosa en SB.

Posteriormente, los COC's se colocaron en los cryotop's y fueron sumergidos en nitrógeno líquido. Después de más de una semana fueron descongelados. La descongelación se realizó sumergiendo el cryotop directamente en la solución de descongelamiento (SD; Anexo 8) por 30 segundos a 40°C, para posteriormente exponerlos a la solución de dilución (SDi; Anexo 9) por 5 minutos a 40°C.

Finalmente, los ovocitos fueron lavados tres veces en SB dejándolos reposar 2 minutos entre cada lavado e incubados a una temperatura de 38.5°C y 6% de CO₂ en SB por 4

horas para su recuperación.

2.2.6. Fertilización *in vitro*

Los COC's madurados *in vitro*, vitrificados y descongelados, fueron colocados en el medio de fertilización compuesto por Talp FIV (Vajta *et al.*, 2000) suplementado con 0,044g/L de piruvato de sodio, 0,03mg/mL de heparina, 50µg/mL de gentamicina y 3,0mg/mL de Suero Albumina Bovina (BSA-FAF) (Anexo 10 y 11)., luego se fertilizaron con espermatozoides de la raza Angus seleccionados y capacitados con la técnica de gradientes de percoll (Parrish *et al.*, 1995) por 18 horas a 38,5°C y 6% de CO₂.

2.2.7. Selección y capacitación espermática

Los espermatozoides fueron colocados en la parte superior de dos concentraciones de medio percoll (90% y 45%; Anexo 12, 13 y 14) y se centrifugó a 2200 rpm por 10 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se agregó medio de fertilización para ser llevado nuevamente a la centrifuga por 5 minutos a 1500rpm para su capacitación; una vez eliminado el sobrenadante se agregó 100µL de medio de fertilización (esta mezcla se utilizó para la fecundación).

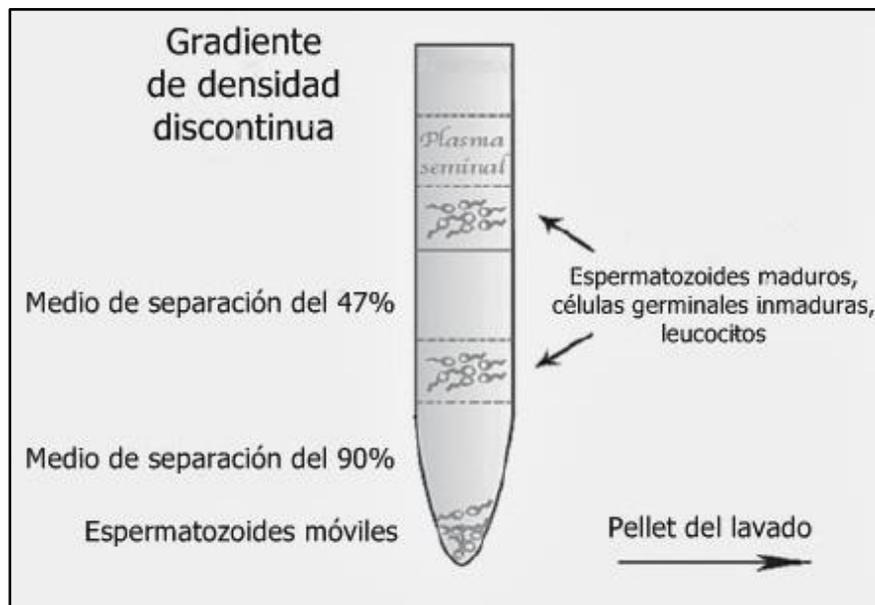


Figura 2. Técnica de gradientes de Percoll de (Parrish *et al.*,1995)

2.2.8. Cultivo *in vitro*

Se cultivaron los cigotos en grupos de 20 en una placa Petri durante 7 días a 38.5°C, con 6% de CO₂, utilizando el medio SOF base (Vajta *et al.*, 2000) (Anexo 15) suplementado con 0.044g/L de piruvato de sodio, 0.039g/L de L-glutamina, 3.0mg/mL de Suero Albumina Bovina (BSA-FAF), 1X de amino ácidos esenciales, 1X de amino ácidos no esenciales, 10mg/mL de EGF, 0.1mg/mL de ácido cítrico, 0.5mg/mL de myo-inositol, 50µg/mL de gentamicina y 2% de SFB (Anexo 16).

2.2.9. Clasificación de embriones

Se realizó la clasificación de las estructuras según la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones IETS (Tabla 6) con el uso de un estereoscopio, a un aumento de 20X.

Tabla 1. Clasificación de embriones, según estado de desarrollo y calidad embrionaria

Estado de desarrollo	Código
Ovocito no fertilizado – UFO	1
Mórula compacta	4
Blastocisto temprano	5
Blastocisto	6
Blastocisto expandido	7
Blastocisto eclosionado	8
Calidad embrionaria	Código
Excelente	1
Bueno	2
Regular	3
Degenerado	4

Fuente: (IETS, 2010).

2.3. Procedimiento para trabajo en campo

2.3.1. Evaluación y selección de receptoras

Las vacas receptoras utilizadas para el trabajo de investigación fueron evaluadas visualmente y se realizó una entrevista al ganadero para determinar las condiciones sanitarias, edad (1.6-5 años), número de partos (0-4 partos) y condición corporal (2.5 a 3) de los animales; se descartó preñez y anormalidades con ecografía.

2.3.2. Sincronización de celo de receptoras

Las receptoras fueron sometidas a un protocolo de sincronización de estro, donde el día cero se aplicó progesterona 1.38 gr (DIB®, Pfizer) más benzoato de estradiol 2 mg (Estrovet®, Montana); el día diez se retiró la progesterona y se aplicó benzoato de estradiol 2 mg (Estrovet®, Montana) más 400 UI de Gonadotropina Corionica Equina (EcG) (Novormon®, Intervet) y prostaglandina F_{2α} como luteolítico 25 mg (Lutalyse®, Pfizer); se esperó que el día doce las receptoras presenten estro y el día 19 se realizó la transferencia de los embriones.

2.3.3. Transferencia de embriones

Los embriones fueron transportados en bolsas selladas con mezcla de gases atemperadas a 37°C hasta el centro poblado de Chontapampa, distrito de Quinjalca, provincia de Chachapoyas previamente identificados según registro y calidad; la transferencia de los embriones se realizó ubicando el cuerpo lúteo (CL) por palpación (CL > 16mm) lo que indicó la aptitud de la vaca como receptora de embrión, las transferencias se realizaron utilizando una pistola de transferencia de embriones (21”) con fundas punta de acero (Agtech, USA) cubierta con camiseta sanitaria, donde la pistola fue dirigida al cuerno ipso lateral del CL funcional, para que el embrión sea depositado en el tercio craneal del cuerno uterino.

2.3.4. Diagnóstico de concepción

Se realizó a los 35 días de transferido el embrión, el diagnóstico fue endorectal por ultrasonografía (Easote, Italia), a una frecuencia de 7.5 Hz.

2.4. Análisis de datos

La presente investigación fue de tipo experimental, explicativa y correlacional; ya que a través del trabajo en laboratorio se obtuvo información referente a las variables de desarrollo embrionario *in vitro* a las cuales se midió el grado de asociación y vinculación.

Se calculó el intervalo de confianza del 95% y el valor p usando la prueba de Chi-cuadrado para los porcentajes de embriones (mórulas y blastocistos) obtenidos *in vitro* a partir del grupo experimental (ovocitos vitrificados) y grupo control (ovocitos sin proceso de vitrificación). Los datos obtenidos se evaluaron utilizando el programa SPSS v 15.0.

III. RESULTADOS

3.1. Estadío nuclear de los complejos cúmulos - ovocitos (COC's)

Posterior a las 24 horas de maduración *in vitro* se pudo observar que los COC's mostraron expansión de las células del cúmulus y extrusión del corpúsculo polar características que indican la llegada a la metafase de la segunda división meiótica (MII) de los COC's (Figura 4).

La Tabla 2 muestra el estadío nuclear de los COC's; se observa que el 12.5% de ovocitos evaluados se encontraban en estadio de vesícula germinal (VG), 5% en metafase I (MI) y 82.5% en metafase II (MII) (Figura 3y 5).

Estos datos nos permitieron determinar que la selección de COC's se realizó de manera adecuada y que el medio utilizado fue apto para lograr la maduración *in vitro* post 24 de incubación.

Tabla 2. Estadío nuclear de los COC's post 24 horas de maduración *in vitro*.

Ovocitos N° (%)	Estadío nuclear		
	VG N° (%)	MI N° (%)	MII N° (%)
80 (100)	10 (12.5)	4 (5)	66 (82.5)

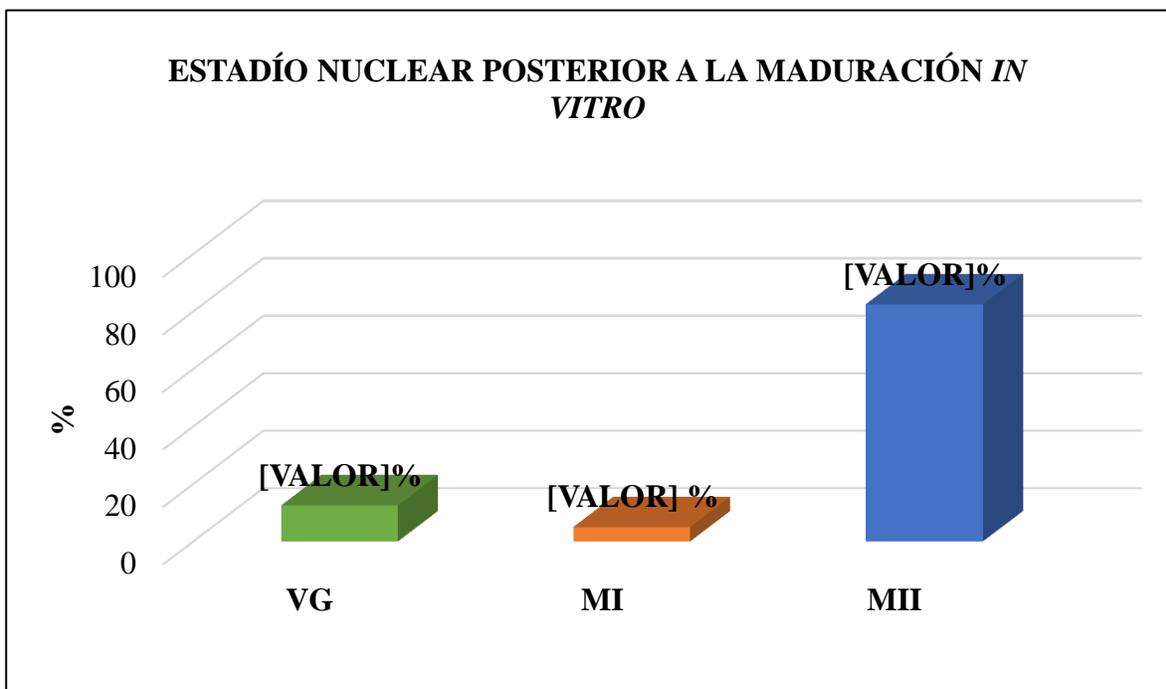


Figura 3. Estadío nuclear de los COC's posterior a 24 horas de maduración *in vitro*.

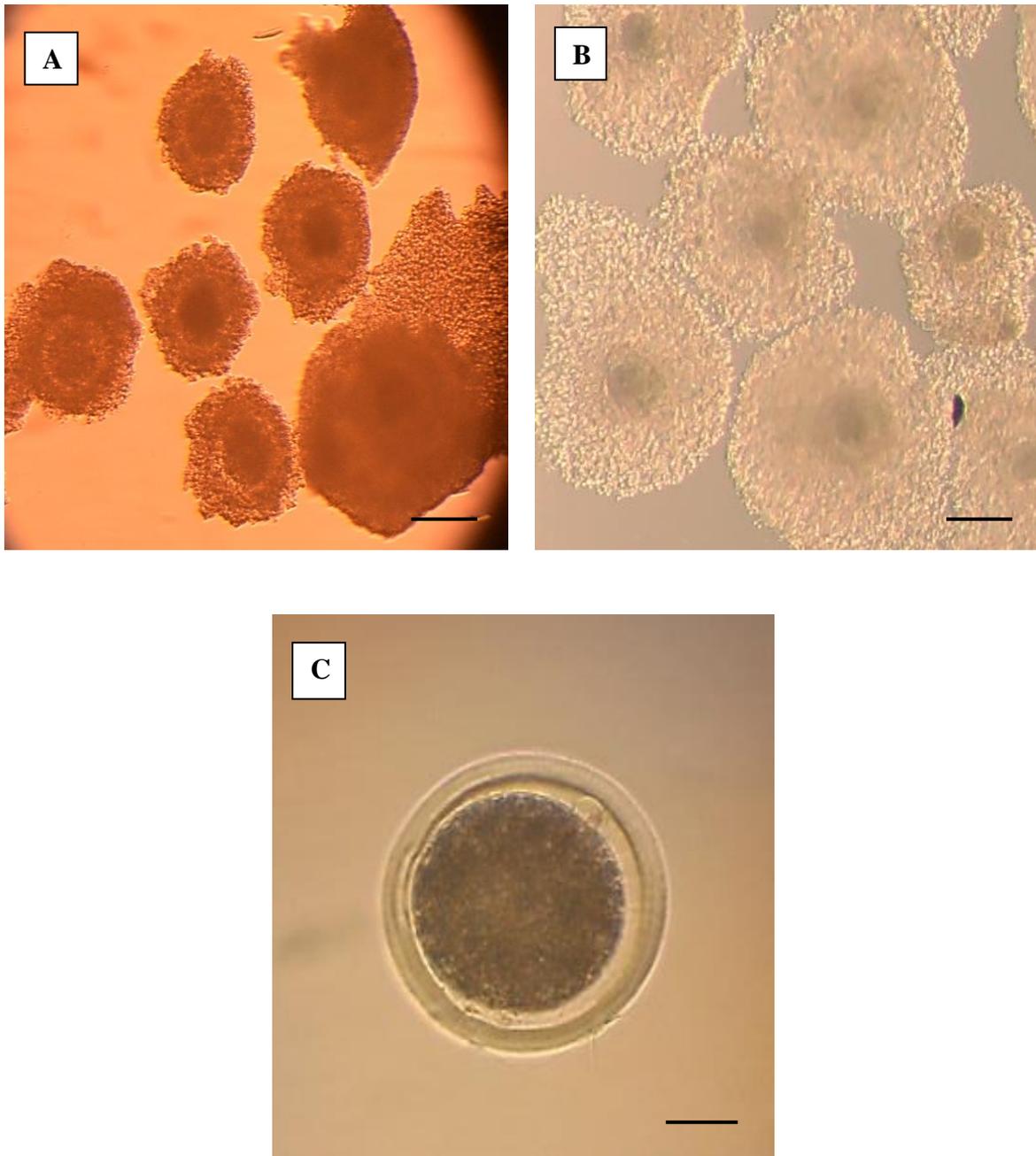


Figura 4. Observación de los complejos cúmulo – ovocitos (COC's) luego de 24 horas de maduración. A. COC's antes de la maduración in vitro. B. COC's posterior a la maduración in vitro, se observa expansión de las células del cúmulo oophorus. C. Aparición del corpúsculo polar en el espacio perivitelino del ovocito (la barra representa 100 μ m en A y B, y 25 μ m en C).

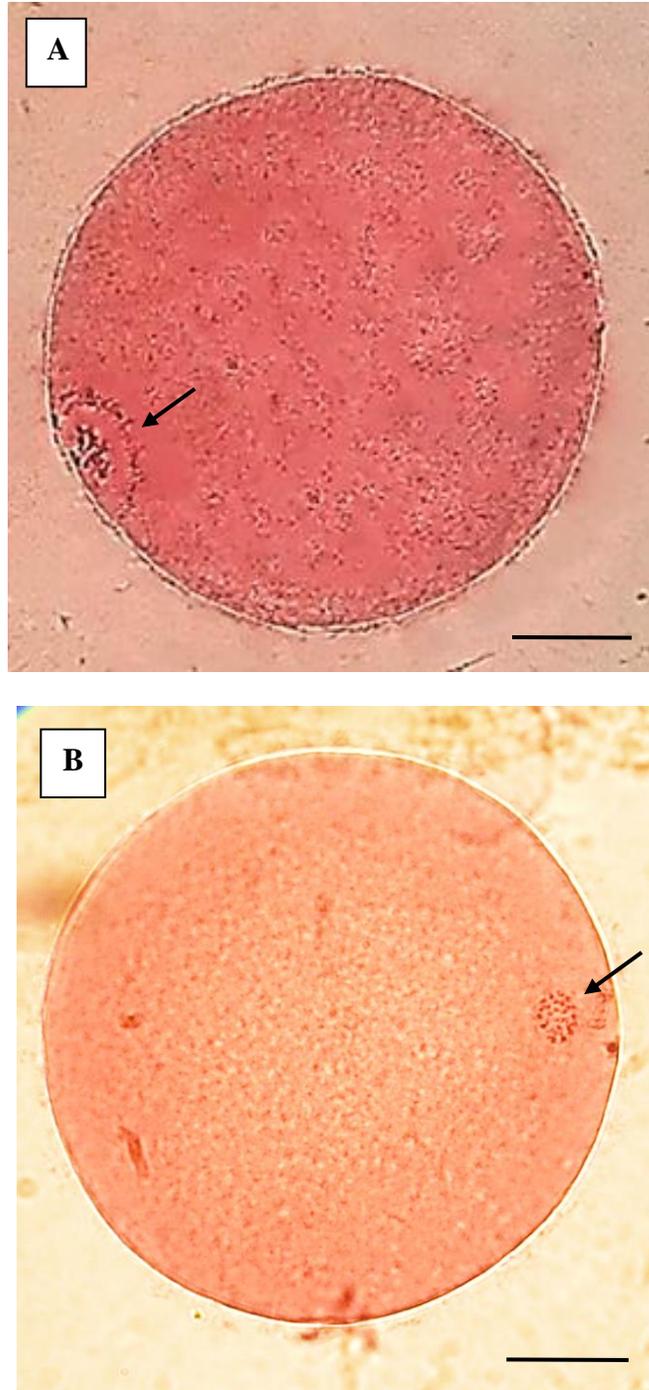


Figura 5. Determinación del estadio nuclear de los COC's con aceto – orceína. A. Ovocito en estadio de vesícula germinal (VG), presenta membrana nuclear intacta y la cromatina en el nucleoplasma. B. Ovocito maduro (metafase II - MII) presenta cromosomas condensados y la ausencia de la membrana nuclear. La barra representa 25µm.

3.2. Desarrollo embrionario *in vitro*

Los ovocitos del grupo experimental (vitrificados y descongelados) y control (sin proceso de vitrificación) fueron fecundados *in vitro* con la metodología descrita anteriormente.

La Tabla 3 muestra el desarrollo embrionario de los cigotos dónde se observa que el porcentaje de mórulas que se obtuvieron fue de 5.8% y 11.6 % para ovocitos vitrificados y grupo control, respectivamente (Figura 6 y 7).

En el caso de la producción de blastocistos se observó que el 10.4% de los COC's del grupo experimental logró alcanzar este estadio frente al 24.9% del grupo control.

Además se observó un clivaje menor de 32 células de 27.3% del grupo experimental y 40.3% para el grupo control; y una tasa de 56.5% y 23.2% de COC's degenerados para el grupo experimental y grupo control, respectivamente.

Tabla 3. Desarrollo embrionario *in vitro* post 7 días de cultivo

Grupo	N°	Degenerados	<32 células	Mórulas	Blastocistos
		N° (%)	N° (%)	N° (%)	N° (%)
Control	181	42 (23.2)	73 (40.3)	21 (11.6) ^a	45 (24.9) ^a
Experimental	154	87 (56.5)	42 (27.3)	9 (5.8) ^a	16 (10.4) ^b

a, b; letras diferentes significa que existen diferencias significativas (p<0.05)
n, número de estructuras

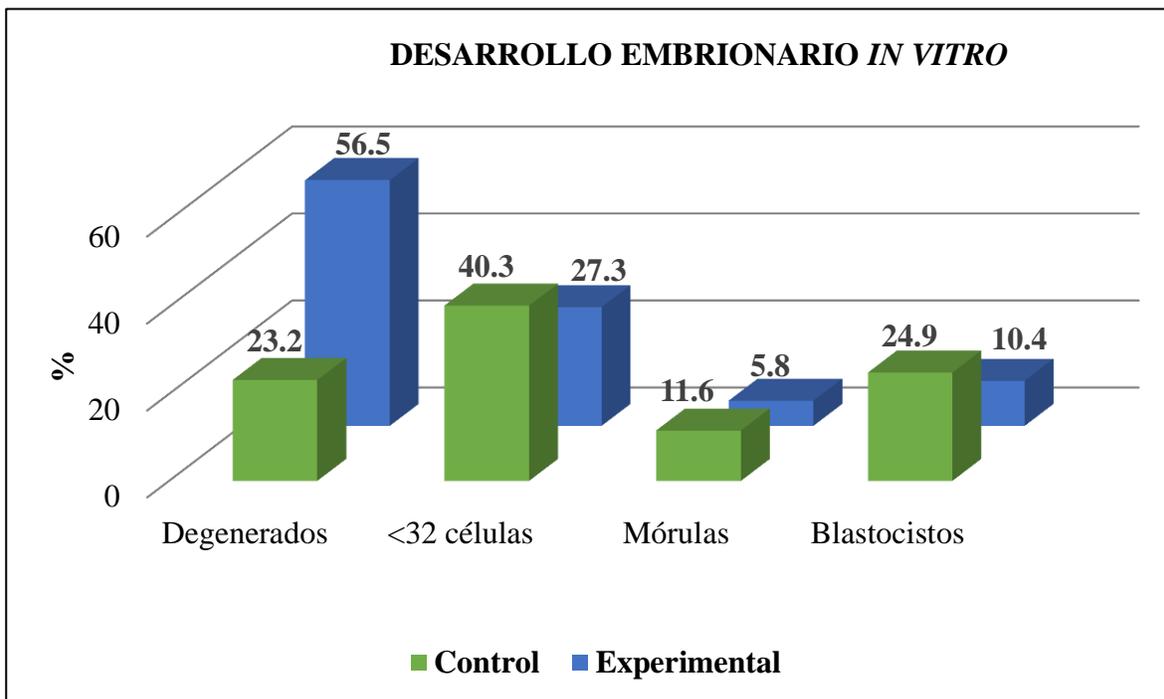


Figura 6. Desarrollo embrionario *in vitro* post 7 días de cultivo

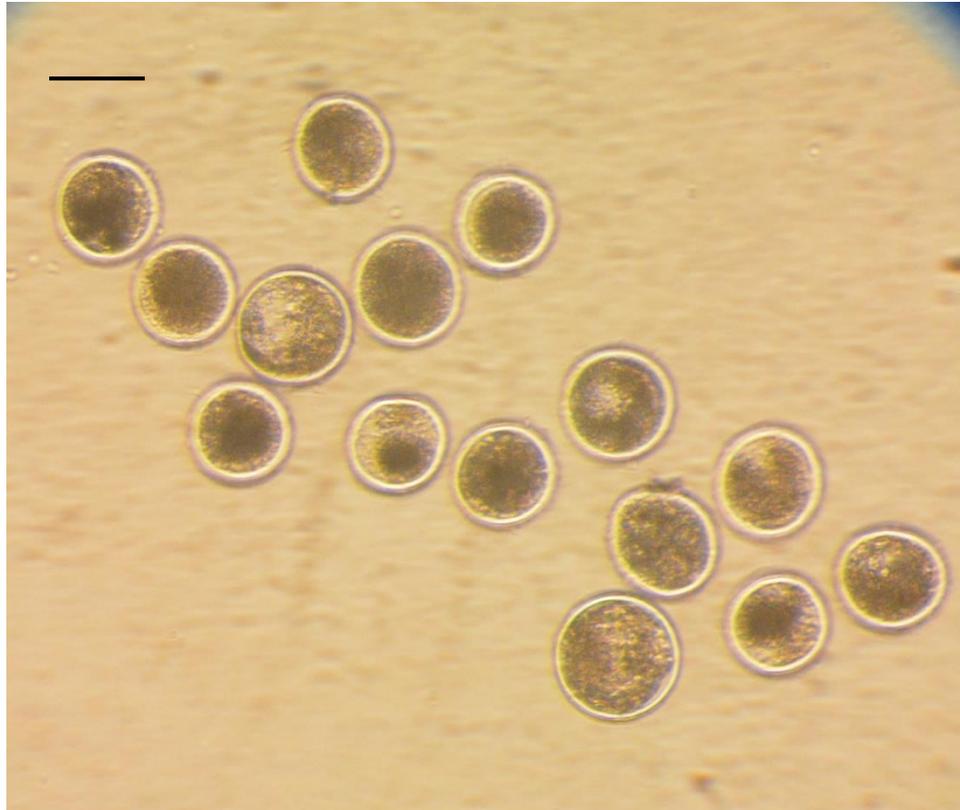


Figura 7. Embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos vitrificados. La barra representa 100 μ m.

3.3. Tasa de concepción

Los embriones producidos por Fertilización *in vitro* y seleccionados de acuerdo a su estado de desarrollo y calidad fueron transferidos en vacas previamente sincronizadas para determinar la capacidad de concepción.

La Tabla 4 muestra que se transfirieron un total de 14 estructuras, de las cuales 8 fueron mórulas y 6 fueron blastocistos.

Por ecografía transrectal se determinó la gestación de los animales, logrando una tasa 21.4% de éxito de concepción (Figura 9).

De las estructuras transferidas se observó que 2 preñeces fueron de blastocistos, lo cual representa un 33.3% (en relación a los 6 blastocistos transferidos) y una preñez fue por mórula, representando un 12.5% en relación a las 8 mórulas transferidas (Figura 8).

Tabla 4. Tasa de concepción de embriones producidos a partir de ovocitos bovinos vitrificados.

Estructura	Embriones transferidos	Receptoras	Concepción N° (%)
Mórulas	8	8	1 (12.5)
Blastocistos	6	6	2 (33.3)
Total	14	14	3 (21.4)

n: número de estructuras

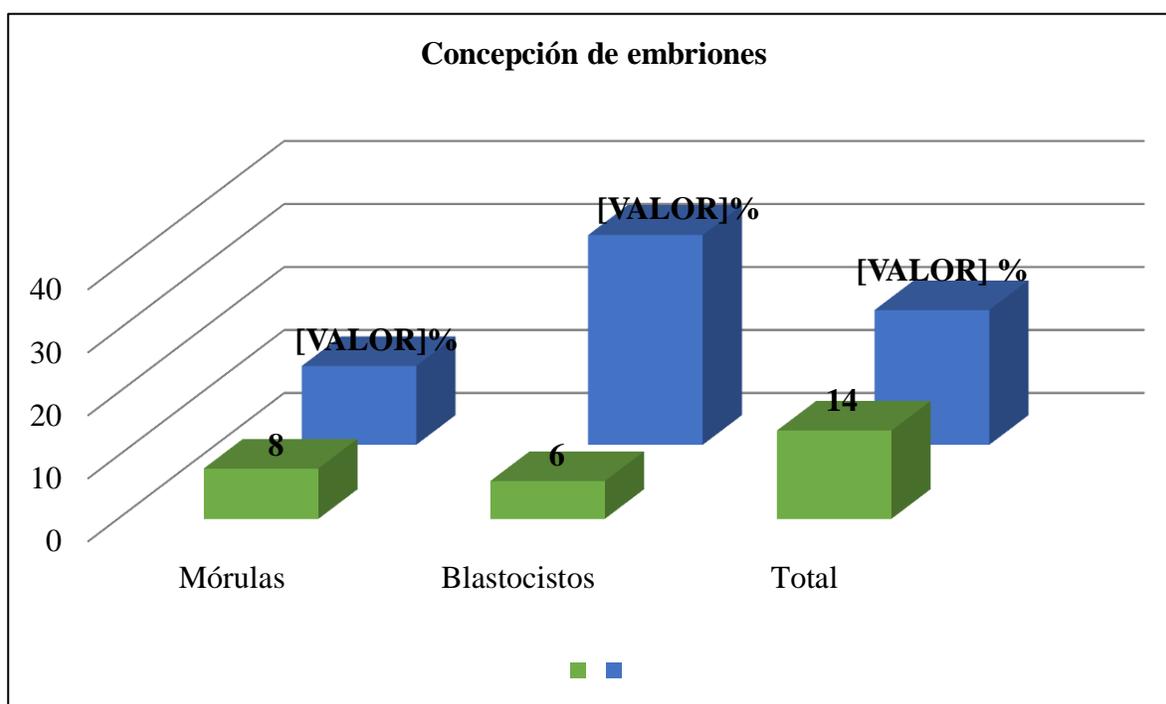


Figura 8. Concepción de embriones producidos a partir de ovocitos bovinos



Figura 9. Ecografía a los 35 días pos transferencia embrionaria. La flecha indica la vesícula embrionaria dentro del líquido amniótico.

IV. DISCUSIÓN

La vitrificación está actualmente considerada como la técnica más eficiente para la criopreservación de ovocitos y embriones; sin embargo, durante este proceso el ovocito puede ser dañado por cambios rápidos y drásticos en las condiciones fisicoquímicas asociadas con la formación de cristales de hielo (Liang *et al.*, 2015) y endurecimiento de la zona pelúcida evitando así su posterior fertilización.

El otro factor importante que afecta a la criopreservación de ovocitos es la etapa de la meiosis en la que se realiza la vitrificación. Los ovocitos se someten a las transiciones en el estatus nuclear durante la maduración. Las propiedades asociadas con cada etapa meiótica incluyen el acoplamiento metabólico entre los ovocitos y las células del cúmulus, la permeabilidad de la membrana plasmática, la presencia o ausencia de una membrana nuclear, husillo acromático y la configuración de los cromosomas (Sprícigo *et al.*, 2014).

En la presente investigación se determinó el estadio nuclear en el que se encontraban los complejos cúmulos-ovocitos (COC's) antes de la vitrificación; obteniendo un 82.5% de COC's en estadio de metafase II (MII); algunos autores observaron mayor ruptura de la membrana celular y daño del citoplasma en ovocitos inmaduros, motivos por los cuales consideran que los ovocitos inmaduros son menos resistentes a la criopreservación y más susceptibles al daño por frío en comparación con ovocitos en estadio de metafase II (MII) (Arav *et al.*, 1996 y Briceño, Cortez, & Cayo, 2015),

Por otro lado, la viabilidad y fertilidad del ovocito se determinó a través del proceso de fertilización *in vitro* y la estimación de la cantidad de embriones producidos por este método (Chen *et al.*, 2016). En el presente trabajo se encontró que el desarrollo de ovocitos fertilizados *in vitro* puede ser significativamente reducido por la vitrificación obteniendo un 5.8% y 10.4% de mórulas y blastocistos; respectivamente en comparación con el grupo control (sin proceso de vitrificación) dónde se obtuvo una tasa de mórulas y blastocistos de 11.6% y 24.9%, respectivamente.

Estos resultados son similares a los encontrados por Liang *et al.*, (2015) quienes obtuvieron una tasa 8.9% de blastocistos a partir de ovocitos bovinos vitrificados, y superiores a los reportados por Sprícigo *et al.*, (2014) quienes obtuvieron una tasa de 4.1% de blastocistos a partir de ovocitos maduros vitrificados por el método del cryotop.

La reducción significativa en el desarrollo de blastocisto en comparación con el control demostró que la vitrificación tiene efectos a largo plazo en el desarrollo de los embriones. El mecanismo exacto del daño no se conoce, pero la despolimerización del huso causado por crioprotectores, combinada con enfriamiento, podría haber sido responsable (Dinnyés *et al.*, 2014).

La capacidad de concepción de los embriones producidos a partir de ovocitos vitrificados fue determinada a los 35 días post transferencia embrionaria, observando que el 24.1% de las estructuras transferidas lograron formar vesícula embrionaria dentro de la receptora; este resultado podría deberse a que las muestras utilizadas en esta investigación eran provenientes de vacas sacrificadas y factores como la restricción de oxígeno y flujo sanguíneo podrían haber dañado la estructura del ovario y por consiguiente la viabilidad de los ovocitos en estudio en comparación de embriones producidos por ovum pick up (OPU) o multiovulación y transferencia de embriones (Colazo & Mapletoft, 2007).

Resultados exitosos de gestación y/o nacimiento de crías vivas a partir de embriones vitrificados se han reportado con la implantación de varias especies de mamíferos como es el caso de Sanches *et al.*, (2016), quienes evaluaron tasas de gestación a los 30 días de embriones vitrificados producidos *in vitro* obteniendo un 35.89% de gestación; pero en el caso de reportes de gestaciones a partir de ovocitos vitrificados aún no se tiene información.

V. CONCLUSIONES

- Se determinó el estadio nuclear de los ovocitos bovinos antes del proceso de vitrificación obteniendo una tasa de 82.5% de ovocitos en metafase II, 5% de ovocitos en metafase I y 12.5% en estadio de vesícula germinal.
- No se encontraron diferencias estadísticas en producción de mórulas entre el grupo control y el grupo experimental, pero si hubo diferencia significativa en la producción de blastocistos entre grupos con un nivel de significancia de 0.05.
- Los embriones producidos a partir de ovocitos vitrificados mostraron que pueden ser gestados con un 24.1% de éxito en preñeces; por lo que, el protocolo de vitrificación utilizado demostró ser adecuado para ovocitos en estadio de metafase II logrando posteriormente producir embriones *in vitro* y tasas de concepción.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albarracín, J. L., & Mogas Amorós, T. (2005). Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica Open Pulled Straw. Retrieved from <http://ddd.uab.cat/record/36503>
- Aman, R., & Parks, J. (1994). Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 50(1), 103–110.
- Arav, A; Zeron, Y; Leslie, SB; Behboodi, E; Anderson GB y Crowe, JH. (1996). Fases de transmisión de temperatura y termosensibilidad de los ovocitos bovinos. *Criobiology*. 33(6):589-599.
- Bautista, G. U., De la Torre, J. F., Fernández, A., Güiris, D. M., Lau, A., León, H., Macias, G. P., Mendoza, P., Ocampo, P., Oliva, M. A., Ibarra, C. E., Peralta, M., Reyes, M. E., Ruiz. H., Sánchez, H., Santiago, F., Trejo, A. A., Yamasaki, A., Yamasaki, L. y Yong, G. (2015). *Reproducción Animal: Temas selectos sobre biotecnología de la reproducción animal*. Chiapas. México. Editorial Copyright de la Universidad Autónoma de Chiapas. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=FRqrCwAAQBAJ&pg=PT5&dq=ovocito+bovino+caracteristicas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiS6L_LvLfZAhUK-2MKHXjvBV8Q6AEINzAE#v=onepage&q=ovocito%20bovino%20caracteristicas&f=false
- Briceño, Y. M., Cortez, J. V., & Cayo, I. (2015). Capacidad de Desarrollo de Ovocitos Vitricados en Estadío Inmaduro y Maduro en Bovinos. 5(1), 24–28. Retrieved from <http://studylib.es/doc/8636340/capacidad-de-desarrollo-de-ovocitos-vitricados-en-estadio>
- Castro, R. (1984). *Producción Bovina*. San José. Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=fBTeyDDWIFQC&pg=PA145&dq=cuando+se+da+la+pubertad+en+bovinos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjr8Nry4bfZAhWEq1MKHYkkA90Q6AEIKTAB#v=onepage&q=cuando%20se%20da%20la%20pubertad%20en%20bovinos&f=false>
- Chen, H., Zhang, L., Deng, T., Zou, P., Wang, Y., Quan, F., & Zhang, Y. (2016). Effects of

- oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology*, 86(3), 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.008>
- Colazo, M. ., & Mapletoft, R. . (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*, 9(1), 20–37. Retrieved from <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n09a03colazo.pdf>
- Dinnyés, a, Dai, Y., Jiang, S., Yang, X., p. Rodriguez Villamil, D. lozano, J.M. Oviedo, F.L. Ongaratto, G. A. B., Rodriguez-Villamil, P., ... Bó, G. A. (2014). High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction*, 49(2), 79–84. <https://doi.org/10.1111/rda.12229>
- Fuku, E., Xia, L., & Downey, B. (1995). Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 32(2), 139–156.
- Hirao, Y., Tsuji, Y., Miyano, T., Okano, A., Miyake, M., Kato S, Moor RM. (1995). Association between p34cdc2levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote*; 3(4):325- 332.
- International Embryo Transfer Society, Manual, IETS. (2010). 67-70 pp.
- Leibo S. P., McGrath J. J. y Cravalho E. G. (1978). Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*. 15(3): 257–271.
- Liang, S., Yuan, B., Kwon, J. W., Ahn, M., Cui, X. S., Bang, J. K., & Kim, N. H. (2015). Effect of antifreeze glycoprotein 8 supplementation during vitrification on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 86(2), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.032>
- Liebfried, L., First, N.L. (1979).Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science*; 48: 76-86.
- Lussier, J.G.; Matton, P.; Dufour, J.J. (1987).Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.*81 (2), 301-307.
- Martins, L., Paulino, E., Alves, A.; Amaral, W.; Osório, T. y Martins, M. (2004). Vitricación de ovocitos desnudados y previamente madurados *in vitro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 33 (5): 1128-1134.
- Men H., Monson R., Parrish J. y Rutledge J. (2003). Degeneration of cryopreserved bovine

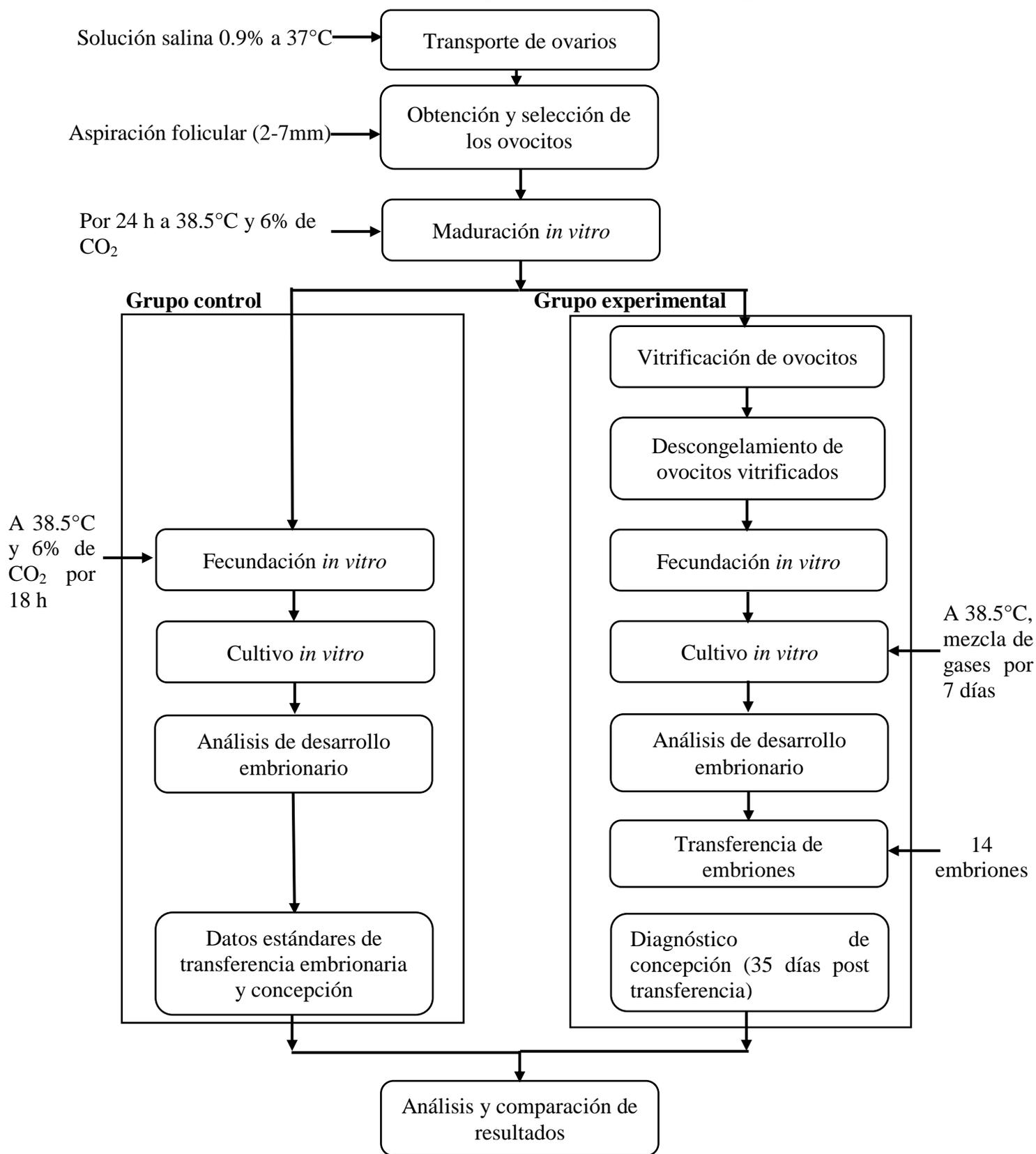
- oocyte vía apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology*. 47: 73–81.
- Motlik, J., Fulka, J. (1976). Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Zool*. 198(2):155- 162.
- Palma, GA. (2001). *Biotechnología de la Reproducción*. 1ª Edición. Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Parkening T. A., Tsunoda Y. y Chang M. C. (1976). Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozenthawed mouse eggs. *Journal of Experimental Zoology*. 197(3): 369–374.
- 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.
- Pugh, P.A.; Tervit, H.R.; Niemann, H. (2003). Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Animal Reproduction Science*, v.58, p.9-22.
- Quintela, L. A., Díaz, C., García, P. J., Peña, A. I., Becerra, J. J. (2006). *Ecografía y reproducción en la vaca*. Santiago de Compostela. España. Imprenta Universitaria. https://books.google.com.pe/books?id=cdfysdaX7WAC&pg=PA24&dq=ubicaci%C3%B3n+de+los+ovarios+de+la+vacas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjK5I69v7fZAhXKxIQKHVwCD_gQ6AEIJTAA#v=onepage&q=oocitos&f=false
- Sanches, B. V., Lunardelli, P. A., Tannura, J. H., Cardoso, L., Colombo, M. H., Gaitkoski, D., ... Seneda, M. M. (2016). A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.029>
- Saragusty, J., & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141(1), 1–19.
- Sprícigo, J. F. W., Morais, K., Ferreira, A. R., Machado, G. M., Gomes, A. C. M., Rumpf, R., ... Dode, M. A. N. (2014). Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: Assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*, 69(2), 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.015>
- Vajta, G., Peura, T., Holm, P., Páldi, A., Greve, T., Trounson, A., Callesen, H. 2000. New method for culture of zona – included or zona free embryos: the well-of-the-well

(WOW) system. *Mol Reprod Dev.* 55:256-264.

Webb R, Garnsworthy P, Gong J, Armstrongy D. (2004). Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal de Animal Science.* 82: 63-74.

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de flujo de la investigación



PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS

Anexo 2. Solución salina.

Solución salina 0.9% para 1L	
NaCl	9g
Agua ultrapura	1L
Estreptomicina	1mL

Anexo 3 Medio de manipulación

Medio de manipulación para 100mL	
TCM-HEPES	90mL
SFB	10mL
Gentamicina	100µL

* Filtrar antes de su uso con filtros de 0.22µm

Anexo 4. Medio de maduración.

Medio de maduración para 10mL	
TCM-199	9mL
SFB	1mL
Piruvato	20µL
FSH-LH	50µL
Glutamina	60µL
EGF	10µL
Estradiol	10µL
Gentamicina	10µL

* Ajustar pH a 7.4 y filtrar antes de su uso con filtros de 0.22µm

Anexo 5. Medio base para vitrificación

Medio base para vitrificación para 50mL		
TCM 199	-	40mL
Hepes		
SFB		10mL

Anexo 6. Medio equilibrante para vitrificación

Medio equilibrante para vitrificación para 10mL	
Etileno glicol	750 μ L
Dimetilsulfóxido	750 μ L
Medio base	Enrazar

Anexo 7. Medio de vitrificación

Medio de vitrificación para 10mL	
Sucrosa	1,7115gr
Etileno glicol	1,5mL
Dimetilsulfóxido	1,5mL
Medio base	Enrazar

Anexo 8. Medio de descongelamiento

Medio de descongelamiento para 10mL	
Sucrosa	3,423gr
Medio base	Enrazar

Anexo 9. Medio de dilución

Medio de descongelamiento para 10mL	
Sucrosa	1.7115gr
Medio base	Enrazar

Anexo 10. Medio de Talp FIV (Fertilización)

Talp-FIV		
	Concentración de trabajo	50mL
NaCl	58.44	0.3331gr
KCl	74.55	0.0119gr
CaCl ₂ + 2H ₂ O	147.00	0.0147gr
MgCl ₂ + 6H ₂ O	203.30	0.0051gr
NaHCO ₃	84.01	0.105gr
NaH ₂ PO ₄	119.98	0.0018gr
Lactato de Na	112.10	0.093mL
Rojo fenol	354.40	0.0005gr

* Ajustar pH a 7.4

Anexo 11. Aditivos para el medio de fertilización

Medio de fertilización para 10mL	
Talp-FIV	10mL
Piruvato	100µL
Heparina	100µL
Gentamicina	10µL
BSA-FAF	0.03gr

* Ajustar pH a 7.4 y filtrar antes de su uso con filtros de 0.22µm

Anexo 12. Medio base para percoll (SP-TL- 10X)

SP-TL-10x para 100mL	
NaCl	4.675gr
KCl	0.23gr
NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O	0.40gr
Hepes	2.38gr

* Ajustar pH a 7.3, filtrar y conservar a 4°C

Anexo 13. Medio de Percoll al 90%

Percoll al 90 % para 40 mL	
SP-TL-10X	4mL
NaHCO ₃	0.084gr
Lactato de Na	90µL
Percoll	36mL
MgCl ₂ + 6H ₂ O	158µL
CaCl ₂ + H ₂ O	78µL

* Ajustar pH a 7.3 – 7.45 y filtrar con filtros de 0.45µm

Anexo 14. Medio SP-TL para percoll de 45%

SP-TL para 100mL	
NaCl	0.5785gr
KCl	0.0230gr
NaHCO ₃	0.2104gr
NaH ₂ PO ₄	0.0047gr
Lactato de Na	0.601mL
Hepes	0.238gr
CaCl ₂ + 2H ₂ O	0.0294gr
MgCl ₂ + 6H ₂ O	0.0224gr

*Ajustar pH a 7.4 y utilizar para combinar el percoll de 90% y lograr el percoll de 45 %

Anexo 15. Medio de cultivo de Fluido Oviductal Sintético (SOF)

Componentes	Conc. de trabajo	200mL	250mL
NaCl	58.44	1258.2mg (100mM)	1572.75mg
KCl	74.55	106.8mg (7mM)	133.5mg
KH ₂ PO ₄	136.1	32.4mg (1.2mM)	40.5mg
CaCl ₂ + 2H ₂ O	147	49.6mg	62mg
MgCl ₂ + 6H ₂ O	203.31	19.2mg	24mg
NaHCO ₃	84.01	421.2mg	526.5mg
Rojo fenol	-.-	0.28mg	0.35mg
Lactato de Na	//1.3g/mL	94.12µL (60%)	117.65µL

*Filtrar y almacenar a 4°C hasta añadir aditivos (3 tubos de 50mL)

Anexo 16. Aditivos para el medio SOF

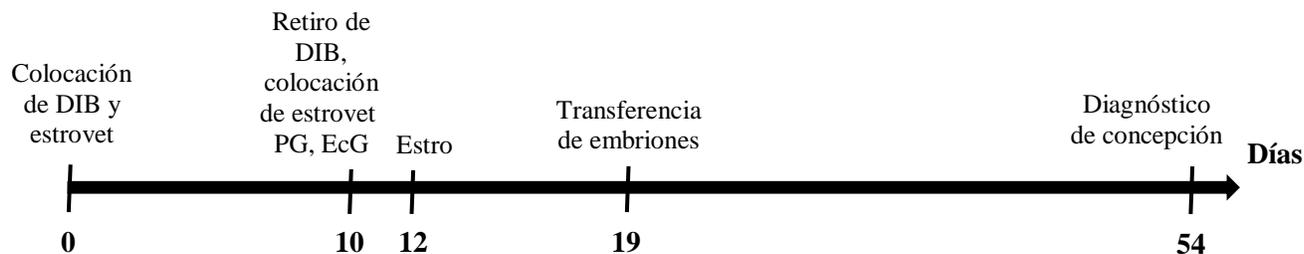
Aditivos SOF (medio de cultivo)			
	100mL	250mL	10mL
Piruvato	400µL	1000µL	40µL
Glutamina	200µL	500µL	20µL
Aminoácidos esenciales	2000µL	5000µL	200µL
Aminoácidos no esenciales	1000µL	2500µL	100µL
EGF	100µL	250µL	10µL
Ac. Cítrico	100µL	250µL	10µL
Myoinositol	1000µL	2500µL	100µL
SFB	2000µL	5000µL	200µL
Gentamicina	100µL	250µL	10µL
BSA FAF	0.3g	750mg	0.03

*Alicuotar en 33 tubos de 15 ml (con 8.9mL c/u de medio SOF)

Anexo 17. Identificación y evaluación de vacas receptoras.

N°	Nombre	Raza	Edad (Años)	Propietario	Nombre del Fundo	Cuerno de Transferencia	Grado de Dificultad	Tamaño de Cuerpo Lúteo	Estructura Transferida Estado:Calidad	Diagnóstico de Concepción
1	Sully	Brown swiss	2	Arturo Culqui Mas	Cariño	Derecho	3	26 mm	5:2	-
2	Melissa	Brown swiss	2	Eliazar Mixán Gomez	Duende Pampa	Izquierdo	1	12 mm	4:3	-
3	Leticia	Brown swiss	1.8	Eliazar Mixán Gomez	Duende Pampa	Izquierdo	2	18 mm	4:2	-
4	Mulata	Brown swiss	3	Eliazar Mixán Gomez	Duende Pampa	Izquierdo	2	19 mm	5:2	-
5	Fresia	Brown swiss	4	Eliazar Mixán Gomez	Duende Pampa	Derecho	2	24 mm	4:1	-
6	Remedio	Brown swiss	3	Eliazar Mixán Gomez	Duende Pampa	Derecho	2	26 mm	5:2	+
7	Chiquita	Brown swiss	5	Marcelino Magallán Soplá	Chontapampa	Izquierdo	2	26 mm	5:3	-
8	Cachuda	Brown swiss	3	Marcelino Magallán Soplá	Chontapampa	Izquierdo	2	28 mm	5:2	-
9	Celeste	Brown swiss	4	Victor Mixán Soplá	Upacha	Izquierdo	2	26 mm	5:1	+
10	Rosita	Brown swiss	3	Victor Mixán Soplá	Upacha	Izquierdo	2	22 mm	4:1	+
11	Negra	Criolla	4	Victor Mixán Soplá	Upacha	Izquierdo	2	20 mm	4:3	-
12	Ciega	Holstein	4	Victor Mixán Soplá	Upacha	Izquierdo	2	22 mm	5:1	-
13	Blanca	Brown swiss	3	William Galoc Culqui	Chontapampa	Izquierdo	3	17 mm	4:1	-
14	Pacucha	Brown swiss	1.6	Genaro Más Más	Chontapampa	Izquierdo	3	22 mm	5:2	-

Anexo 18. Protocolo de sincronización



Anexo 19. Tabla de contingencia para evaluación del grupo de mórulas

			Grupo		Total
			Control	Experimental	
Evaluación	no mórula	Recuento	160	145	305
		% de grupo	88.4%	94.2%	91.0%
	mórula	Recuento	21	9	30
		% de grupo	11.6%	5.8%	9.0%
Total		Recuento	181	154	335
		% de grupo	100.0%	100.0%	100.0%

Anexo 20. Pruebas de chi-cuadrado para el grupo de mórulas

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.384(b)	1	.066		
Corrección por continuidad(a)	2.714	1	.099		
Razón de verosimilitudes	3.496	1	.061		
Estadístico exacto de Fisher				.084	.048
Asociación lineal por lineal	3.373	1	.066		
N de casos válidos	335				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 13.79.

Anexo 21. Tabla de contingencia para evaluación del grupo de blastocistos

			Grupo		Total
			Control	Experimental	
Blastocisto	0	Recuento	136	138	274
		% de grupo	75.1%	89.6%	81.8%
	1	Recuento	45	16	61
		% de grupo	24.9%	10.4%	18.2%
Total		Recuento	181	154	335
		% de grupo	100.0%	100.0%	100.0%

Anexo 22. Pruebas de chi-cuadrado para el grupo de blastocistos

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11.701(b)	1	.001		
Corrección por continuidad(a)	10.750	1	.001		
Razón de verosimilitudes	12.196	1	.000		
Estadístico exacto de Fisher				.001	.000
Asociación lineal por lineal	11.666	1	.001		
N de casos válidos	335				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 28.04.

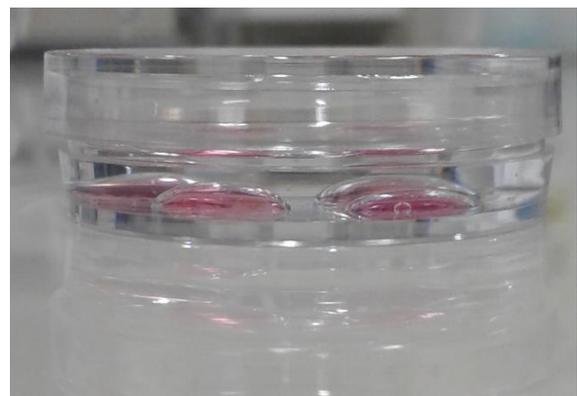
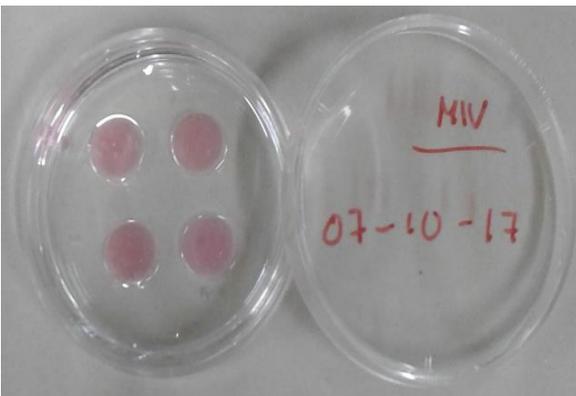
Anexo 23. Selección de donadoras y colección de muestras.



Anexo 24. Aspiración folicular, búsqueda y selección de COC's.



Anexo 25. Maduración *in vitro* de ovocitos



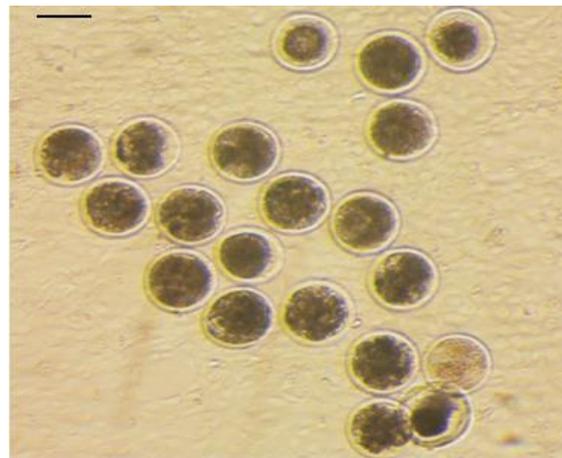
Anexo 26. Cryotop para la criopreservación de ovocitos



Anexo 27. Selección y capacitación espermática



Anexo 28. Cultivo *in vitro*



Anexo 29. Materiales utilizados para la sincronización de receptoras.



Anexo 30. Diagnóstico de concepción.

