

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



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

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA

**EFFECTO DE CÉLULAS ALIMENTADORAS INACTIVADAS EN EL
DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS.**

TESIS

Para obtener el título profesional de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR : Bach. MARIGEIDY SANTIAGO QUIJANO.

ASESOR : M.V. NILTON LUIS MURGA VALDERRAMA.

COLABORADOR : Blgo. JENIN VÍCTOR CORTEZ POLANCO.

**CHACHAPOYAS – PERÚ
2018**

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a Dios, por haberme dado la vida, la capacidad, sabiduría para realizar esta investigación y hacer que culmine mi carrera profesional.

A mis padres José Victor y Alcira, por mostrarme el camino a la superación con la perseverancia, por brindarme su apoyo, sus consejos y el amor incondicional.

A mis hermanas Jesica y Marily por brindarme su tiempo y siempre estar conmigo, que más que hermanas son mis mejores amigas.

A mis docentes, amigos y compañeros, quienes transmitieron sus conocimientos contribuyendo al logro de mis metas y objetivos, sin recibir nada a cambio.

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios por darme la vida, salud, bendición y amor brindado para la realización de mi tesis.

A mis padres, por haberme brindado la mejor educación, apoyo económico, lección de vida, por enseñarme que, con esfuerzo, trabajo, perseverancia y dedicación, se consigue todo, y que en esta vida nadie regala nada. Gracias por cada día hacerme una buena hija, ver la vida de una forma diferente y confiar en mis decisiones. A mis hermanas por lo que representan para mí, por ser parte importante de una hermosa familia unida.

Agradecer a mis Asesores de tesis, M.V. Nilton Luis Murga Valderrama y Blgo. Jenin Víctor Cortez Polanco, que sin su ayuda y gracias a los conocimientos brindados no hubiese sido posible realizar esta investigación.

A mis compañeros y amigos con lo que hemos compartido grandes momentos académicos y brindarme su amistad.

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

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

RECTOR

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. FLOR TERESA GARCIA HUAMAN

VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Ph.D. ILSE SILVIA CAYO COLCA

DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA

VISTO BUENO DEL ASESOR

El docente de la UNTRM - Amazonas que suscribe, hace constar que ha asesorado el proyecto y la realización de la tesis titulada **“EFECTO DE CÉLULAS ALIMENTADORAS INACTIVADAS EN EL DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS”** presentado por Marigeidy Santiago Quijano, egresado de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista de la UNTRM-Amazonas.

Se da el visto bueno al informe final de la tesis mencionada y comprometiéndose a supervisar el levantamiento de las observaciones dadas por el jurado evaluador, para su posterior sustentación.

Chachapoyas, de de 2018

M.V. NILTON LUIS MURGA VALDERRAMA.

Profesor Auxiliar de la UNTRM

DNI: 33430926

JURADO EVALUADOR

Ing. CESAR AUGUSTO MARAVÍ CARMEN

Presidente

Ph.D. ILSE SILVIA CAYO COLCA

Secretario

M.V. MARTHA ELIZABETH VÁSQUEZ ESLAVA

Vocal

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo, Marigeidy Santiago Quijano identificado con DNI 74628809 estudiante de la escuela profesional de Ingeniería Zootecnista de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocio y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:
Efecto de células alimentadoras inactivadas en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos.
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 o título profesional.
5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificadas, ni duplicados, ni copiados

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda la 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. Así mismo, 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, piraterías, 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,.... de..... del 2018

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AUTORIDADES UNIVERSITARIAS	iv
VISTO BUENO DEL ASESOR	v
JURADO EVALUADOR	vi
DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO	vii
ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACION DE TESIS	viii
ÍNDICE GENERAL	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	14
II. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos generales	16
2.2. Objetivos específicos	16
III. MARCO TEÓRICO	17
3.1. Antecedentes de la investigación	17
3.2. Bases teóricas	21
3.3. Definiciones de términos básicos	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1. Materiales	30
4.2. Métodos	30
V. RESULTADOS	35
VI. DISCUSIONES	41
VII. CONCLUSIONES	42
VIII. RECOMENDACIONES	43
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
X. ANEXOS	52

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura N° 01	Anatomía del ovario de la vaca	23
Figura N° 02	Características del espermatozoide bovino	26
Figura N° 03	Anatomía del oviducto bovino	28
Figura N° 04	Líneas celulares del ampulla y el istmo	36
Figura N° 05	Porcentaje de maduración <i>in vitro</i>	37
Figura N° 06	Expansión de las células del <i>cúmulus oophorus</i>	38
Figura N° 07	Co-cultivo <i>in vitro</i> de embriones bovinos	39
Figura N° 08	Blastocisto co-cultivados con el sistema feeder layer y sistema tradicional.	40

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla N° 01	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	37
Tabla N° 02	Co-cultivo <i>in vitro</i> de embriones bovinos	39

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo N° 01	Estado del desarrollo embrionario	52
Anexo N° 02	Esquema experimental de la investigación	53
Anexo N° 03	Procesos de inactivación de células	54
Anexo N° 04	Protocolo para la preparación de medios para la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	55
Anexo N° 05	Procesamiento del sistema feeder layer	60
Anexo N° 06	Crecimiento e inactivación de las líneas celulares	61
Anexo N° 07	Producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	62
Anexo N° 08	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos	63
Anexo N° 09	Co-cultivo <i>in vitro</i> de embriones bovinos	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AND	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BFS	Suero fetal bovino
CAB	Células del ámpula bovino
CB	Células combinadas (ámpula e istmo)
CFE	Células de fibroblastos dérmicos
CIB	Células del istmo bovino
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CCIV	Co-cultivo <i>in vitro</i>
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
FSH	Folículo estimulante
IETS	Sociedad internacional de transferencia de embriones
LH	Luteinizante
MFF	Micosis fungoide folicular
MMC	Mitomicina – C
MIV	Maduración <i>in vitro</i>
PIV	Producción <i>in vitro</i>
TRA	Técnica de reproducción asistida
SCB	Sin células bovina

RESUMEN

El estudio pretende mejorar el sistema de cultivo convencional de embriones utilizando co-cultivo con células inactivadas. Para ello se inactivaron células provenientes del istmo y ámpula, con Mitomicina C (40 µg/ml) para inhibir la capacidad de división. Los ovocitos se maduraron *in vitro* durante 24 h, se fertilizaron durante 18 h en cultivo convencional y se cultivaron durante 7 días en un sistema de co-cultivo con células inactivadas (1.44 x 10⁵ de células/pocillo 500 µl) provenientes del istmo y ámpula, por separado (2.88 x 10⁵ de células/ml). Los resultados se evaluaron con un diseño completamente al azar (DCA) con sub muestra con tres tratamientos, realizando un ANOVA y prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Se concluye existe diferencias significativas de las células alimentadoras inactivadas comparada con el control (sin células alimentadoras). En conclusión, el co-cultivo con células alimentadoras inactivadas provenientes del Ámpula e istmo sirven como un soporte en la viabilidad del desarrollo embrionario.

Palabras claves: Palabras claves: Mitomicina C, embrión, co-cultivo, istmo, ámpula.

ABSTRACT

The study wants to improve the conventional embryo culture system by using co-culture with inactivated cells. For this, cells from the isthmus and ampulla were inactivated, with Mitomycin C (40 µg/ml) to inhibit the ability to divide. The oocytes were matured *in vitro* for 24 hours, fertilized for 18 hours in conventional culture and cultivated for 7 days in a co-culture system with inactivated cells (1.44 x 10⁵ cells/well 500 µl) and separated from the isthmus and ampulla (2.88 x 10⁵ cells/ml). The results were evaluated with a completely randomized design (DCA) and sub sample with three treatments, making ANOVA and Tukey test ($\alpha = 0.05$). It is concluded that there are significant differences of the inactivated feeder cells compared with the control (without feeder cells). In conclusion, co-culture with inactivated feeder cells from the ampulla and isthmus serve as a support in the viability of embryonic development.

Key words: Keywords: Mitomycin C, embryo, co-culture, isthmus, ampulla.

I. INTRODUCCIÓN

La última década del siglo pasado, se caracterizó por ser un período relevante, refiriéndose al desarrollo de tecnologías directas para la reproducción y para el mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. El número de embriones bovinos producidos *in vitro* a nivel mundial ha crecido rápidamente. Así mismo, vivimos en la era de la reproducción y la biotecnología, existiendo muchos estudios dirigidos al mejoramiento de estas herramientas biotecnológicas (Hansen, 2006).

Con el constante aumento de la población mundial y las deficiencias nutricionales en muchas partes del mundo, la biotecnología reproductiva es una herramienta que podría ser la clave para el desarrollo agropecuario y poder generar la suficiente cantidad de alimento para cubrir las necesidades de una población en constante crecimiento (Urrego y Restrepo, 2006).

Los países como Panamá y Uruguay tuvieron un aporte importante del 1% y 0,32% correspondiente a 2.905 y 850 embriones producidos respectivamente. Argentina obtuvo 292 embriones producidos *in vitro* (Ruiz, 2006). En Colombia, la tasa de adopción de la biotecnología pecuaria en el 2009, fue de 130.000 unidades anuales (Gutiérrez, 2010).

Actualmente, se observa la intervención de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, la cual viene ejecutando dos importantes proyectos de mejoramiento ganadero, trabajando con nuevas biotecnologías como la transferencia de embriones y la introducción de ganado vacuno de alto valor genético. Esta institución requiere información del contexto social y económico en el que se desarrollan los pobladores de las importantes cuencas ganaderas, con la finalidad de mejorar su intervención y poder desarrollar tecnologías sostenibles que generen un cambio en el mejoramiento del ganado vacuno, contribuyendo de esta manera con el desarrollo local (Vásquez, 2016).

Gardner *et al* (2000), indica que el mejoramiento genético involucra el empleo de tecnologías reproductivas y biotecnológicas tales como la inseminación artificial (AI), la ovulación múltiple, la transferencia de embriones, la fertilización *in vitro*, la selección asistida por marcadores genéticos, por lo general estas herramientas son de suma importancia para obtener una buena producción ganadera.

Sin embargo, es importante señalar que el desarrollo de embriones bovinos cultivados *in vitro*, ha presentado una serie de dificultades, particularmente en aquellos que han sido producidos después de la maduración y fecundación de ovocitos *in vitro*. Es difícil determinar si el problema se debe directamente a condiciones no óptimas de cultivo de los embriones o si se debe a la reducción del desarrollo de competencia de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro*. Fernández (1996), en su investigación de fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú pos mortem concluye que la mayor dificultad es durante el proceso del cultivo *in vitro*.

El objetivo principal de esta tesis es evaluar el efecto de las células alimentadoras inactivadas en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos, utilizando las dos líneas celulares del oviducto bovino (ámpula e istmo) para mejorar la eficiencia en términos de desarrollo, calidad y viabilidad embrionaria.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de las células alimentadoras inactivadas en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos.

2.2. Objetivo específicos

- Determinar el porcentaje de la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes de la investigación

Durante muchos años se ha tratado de reproducir artificialmente los eventos de la maduración y la fertilización de ovocitos, así como el desarrollo embrionario temprano. Al inicio, la producción embrionaria *in vitro* sólo tenía fines científicos; sin embargo, en las últimas dos décadas se ha comenzado a utilizar como técnica la biotecnología reproductiva de tercera generación (sexaje y clonación de embriones *in vitro*) (Thibier, 1993). La producción *in vitro* (PIV) de embriones es una herramienta útil para el estudio y comprensión del desarrollo embrionario temprano en mamíferos, con aplicaciones que van desde el tratamiento de problemas en reproducción humana hasta la conservación de gametos de animales de alto valor genético, permitiendo el manejo de una gran población y a bajo costo. La PIV de embriones se engloba en tres etapas (cuatro si tenemos en cuenta la recolección de los ovarios): maduración, fecundación y cultivo *in vitro* (CIV). En el tracto reproductivo femenino existen diversos factores y señales tróficas necesarias para el desarrollo embrionario.

Estos tres pasos comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, donde cada uno condiciona el éxito o fracaso del siguiente. La tasa de maduración de ovocitos bovinos es alta; aproximadamente de 80 a 90%, la fecundación *in vitro* tiene menor resultado, llegando solo hasta la etapa de 2 a 4 células y pocos son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto. Siendo la tasa de desarrollo de blastocisto *in vitro* entre 30 y 40 % (Mucci *et al.*, 2006).

La producción de embriones *in vitro* continúa siendo un proceso ineficiente: el 90% de los ovocitos inmaduros maduran desde la profase I a la metafase II y sólo el 80% de los ovocitos maduros son fecundados y alcanzan el estadio de dos blastómeras. Tan sólo entre un 30% y 40% de los ovocitos inmaduros logran alcanzar el estadio de blastocisto al día 7 y 8 tras la fecundación (Rizos *et al.*, 2008).

En la maduración de ovocitos suceden una serie de modificaciones dirigidas a la maduración citoplasmática y a la expulsión del corpúsculo polar. También se produce

una maduración nuclear del ovocito progresando desde la profase I a la metafase II (Pincus y Enzamann, 1935). Estos acontecimientos preparan al ovocito para la fecundación y el subsiguiente desarrollo embrionario preimplantacional. La maduración *in vitro* (MIV) es una etapa muy importante y afecta al posterior desarrollo embrionario. De hecho, la calidad ovocitaria repercute en el porcentaje de ovocitos inmaduros que darán lugar a futuros embriones (Rizos *et al.*, 2002).

En la utilización de las técnicas de reproducción asistida (TRA) existen fracasos, baja tasa de preñez y la implantación después de la transferencia de embriones en estadio temprano o blastocisto. El recurrente fracaso en la implantación y los repetidos abortos puede ser causados por la incapacidad del embrión, la replicación genética, trastornos hormonales (efectos negativos de los protocolos de estimulación ovárica), problemas inmunológicos, a sincronía embrionaria-endometrio durante la entrada para la implantación (Levitas *et al.*, 2004) en su investigación la transferencia de embriones en estadio de blastocito en pacientes que no lograron concebir en tres o más días, en 2-3 ciclos de transferencia de embriones, concluye que hay diversos factores y motivos que conlleven a un fracaso de los embriones como en estadio temprano o blastocisto.

El sistema embrionario se enfrenta con el problema de desarrollo durante el ciclo celular que corresponde a la activación genómica (Camous *et al.*, 1984; Heyman *et al.*, 1987). En la biotecnología animal los sistemas de cultivo de embriones de mamíferos dependen del sistema “feeder layer” con el fin de lograr la transferencia de embriones. La transferencia de embriones en los animales sólo pueden realizarse en la fase de blastocisto, estadios más tempranos de desarrollo después de la fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo, antes del día cinco da lugar a que los embriones sean expulsados en la vagina.

Los requisitos para el desarrollo de embriones tempranos de animales domésticos no se han definido, los intentos de cultivar embriones de animales domésticos están centrados en la selección de medios y aditivos, atmósfera de gas y etapa de desarrollo de los embriones. Otro enfoque que define los requisitos de los embriones para su desarrollo es co-cultivar los embriones con otros tipos de células que proporcionan un estímulo para el desarrollo de los embriones. Los exitosos sistemas de co-cultura podrían analizarse

para determinar la naturaleza del soporte que proporcionan para los embriones. Los dos sistemas de co-cultura que parecen prometedoras son de co-cultura con vesículas trofoblásticas y las monocapas celulares (Kuzan y Wright, 1981).

En estos últimos años, los investigadores tienen la capacidad de mejorar el desarrollo *in vitro* utilizando células "ayudantes" en un sistema "feeder layer" de embriones, Rexroad, 1989, en su investigación de co-cultivo de embriones de animales domésticos concluye que se debería de mejorar el desarrollo *in vitro* con células ayudantes con un sistema feeder layer de embriones, por lo tanto, esta investigación llevaría al óptimo éxito en el desarrollo *in vitro*. Sin embargo, durante casi una década se ha generado una controversia creciente distinguiendo cual es el más efectivo usando células auxiliares. Recientemente se ha reportado éxito en el desarrollo óptimo del embrión después de la etapa de bloqueo *in vitro* del sistema feeder layer. Se han utilizado vesículas trofoblásticas (Pool *et al.*, 1988) y células epiteliales oviductales (Ellington *et al.*, 1990) de ovejas y bovinos para la realización del sistema feeder layer para el desarrollo de los embriones, en reemplazo de células tradicionales de cuernos uterino (fibroblastos). Se está haciendo uso del sistema feeder layer de los oviductos para mejorar el desarrollo de embriones en oveja (Gandolfi y Moor, 1987). El uso de tejido oviductal en el embrión mediante el sistema de feeder layer ha recibido mayor atención en un esfuerzo por comprender los mecanismos de las células colaboradoras que interactúan con los embriones para mejorar el desarrollo *in vitro* de los embriones. Otros investigadores han evaluado el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos utilizando oviducto fresco o congelado-descongelado de células para la realización del sistema feeder layer (Ellington *et al.*, 1990; Rexroad y Powell, 1988).

El sistema feeder layer de embriones junto con otras líneas celulares puede disminuir el estrés oxidativo a través de las funciones químicas beneficiosas que estas células producen (Mermillod *et al.*, 1993).

El sistema de feeder layer es una idea atractiva para co-cultivar embriones tempranos con una monocapa de células oviductales y para co-cultivar embriones más desarrollados (mórulas o blastocistos) en una monocapa de células uterinas. Este concepto supone que la monocapa proporciona algún estímulo específico durante el desarrollo del embrión.

Varios investigadores han usado células del tracto reproductivo para co-cultivar embriones. Las células de los oviductos de ovinos han sido aisladas raspando la superficie luminal de los oviductos disecados (Rexroad y Powell, 1986; Rexroad y Powell, 1988b) o simplemente recolectando células que fueron lavadas de los oviductos durante recuperación de embriones como explica Gandolfi y Moor, (1987).

Los fibroblastos endometriales uterinos para el co-cultivo se obtuvieron por cultivar explantes de endometrio bovino y subvertir las células después de la tripsinización (Kuzan y Wright, 1982). Los fibroblastos se utilizaron para el co-cultivo *in vitro* (CCIV) después de tres a cinco subpasos. Este método tiene la ventaja de preparar un pozo de línea definida de fibroblastos. Se han usado células oviductales y granulosa para el CCIV de mórulas y blastocistos. Se ha observado que en el co-cultivo con células uterinas los embriones bovinos tempranos se desarrollan en blastocistos (Lawson, *et al.*, 1972; Boland, 1980; Eyestone, *et al.*, 1985). En las literaturas no hay comparaciones para definir si las células uterinas dan como resultado un mayor desarrollo de mórula y blastocistos que las células oviductales. Podría esperarse que las células del tracto reproductivo sean buenos candidatos para la co-cultura de embriones. Rexroad y Powell, (1988a) señala que, en ovinos, los co-cultivos de tres días favorecen la implantación de embriones. Los embriones co-cultivados con células oviductales se ascendieron con más frecuencia que embriones co-cultivados con una monocapa de células uterinas o de riñón. De manera similar, Gandolfi y Moor, 1987 reportaron que los embriones co-cultivados con las células oviductales produjeron más fetos después de realizado la transferencia a las receptoras.

La actividad metabólica de las células alimentadoras debe mantenerse después de la inhibición de la proliferación celular para permitir la expresión de citosinas específicas y secreción de células y factores solubles (Park *et al.*, 2003; Villa *et al.*, 2009). Por lo general, la inhibición de la proliferación en las células alimentadoras se logra exponiendo las células a Mitomicina-C (MMC) o irradiación gamma. La MMC es un antibiótico antitumoral ampliamente utilizado en terapia anticancerígenos que inhiben la separación de la doble cadena de ADN (Gutteridge *et al.*, 1984; Iyer y Szybalski, 1964). Aunque cualquier tratamiento se puede usar para inhibir la proliferación de células de

alimentación, la MMC se utiliza con frecuencia debido a su bajo costo y disponibilidad, una dosis de 10 g/ml de MMC para 2.5 h se usa comúnmente para inhibir la proliferación de fibroblastos embrionarios de ratón (MFF) y fibroblastos fetales humanos (Reubinoff *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008).

Estudios realizados en células vivas de la capa alimentadora tiene la capacidad de promover la adhesión, crecimiento y diferenciación *in vitro* de las células *in vitro* de las células epiteliales, ya que secretan factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular que inhiben el sobrecimiento de los fibroblastos dérmicos (Arvelo *et al.*, 2004).

El oviducto y el útero son los órganos sistema reproductivo. Se ha pensado que durante mucho tiempo el oviducto sirve como un conducto pasivo para el gameto y embrión (es) en los primeros eventos reproductivos. Numerosos estudios se han realizado durante las dos últimas décadas, descubriendo que el oviducto está involucrado en varios procesos importantes que son necesarios para el desarrollo apropiado del embrión temprano (Leen y Yeung, 2006; Coy *et al.*, 2008; Avilés *et al.*, 2010; Besenfelder *et al.*, 2012).

Smith (2012), en varios estudios ha evaluado diversas condiciones con el fin de mejorar la tasa de desarrollo embrionario y calidad *in vitro*. El primer embrión de mamífero en un sistema de CIV ha utilizado la biotecnología animal doméstica.

3.2. Bases teóricas

3.2.1. Producción de embriones a través de fertilización *in vitro*.

Blandau (1980) en los principios de los años 80 se produjo finalmente un becerro de fertilización *in vitro*. Brackett *et al.*, (1982) fueron los primeros en publicar el nacimiento de un ternero saludable, que ocurrió el 9 de junio de 1981 producido por fertilización *in vitro*.

La producción de embriones a través de fertilización *in vitro* se realiza dentro de un laboratorio, donde el ovocito pasa por un proceso de maduración para luego ser expuesto a espermatozoides previamente capacitados para que se produzca la

fecundación proveyendo las condiciones adecuadas que simulen el proceso que se da de manera natural (Pretty, 1994).

3.2.2. Dinámica folicular

El ovario es el órgano fundamental del sistema reproductivo. Cumple dos importantes funciones: sintetiza hormonas y genera la gameta femenina. Ambas funciones son reguladas por las gonadotrofinas hipofisarias, folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) y están coordinadas con las propias secreciones del ovario para producir una gameta madura adecuada para su fertilización. La estructura funcional del ovario es muy dinámica; en el término de pocos días de desarrollo de un grupo de folículos seleccionados solo uno destinado a ovular y generar un nuevo órgano endocrino (cuerpo lúteo). Estos fenómenos han sido intensamente estudiados en los últimos años. Sin embargo, los mecanismos que inician el crecimiento folicular y que determinan la selección del folículo ovulatorio son todavía poco conocidos. Es así que aún tiene vigencia la frase: «Uno de los más intrigantes misterios de la fisiología ovárica es qué factores determinan que un folículo permanezca quieto, otro comience a desarrollarse, pero luego se vuelva atrésicos, mientras un tercero madura y ovula» (Greenwald, 1972). Las funciones del ovario no son solamente reguladas por las gonadotrofinas sino también por factores endocrinos independientes de la hipófisis. Estos factores son las hormonas producidas en el mismo ovario, las que por actuar localmente se las denomina reguladores autocrinos y paracrinos; entendiéndose por autocrino al efecto de una hormona sobre el funcionamiento de la célula que la produce y paracrino al efecto de una hormona sobre el funcionamiento de una célula o grupo celular adyacente. Se especula que los reguladores autocrinos y paracrinos podrían tener un rol importante en el desarrollo y selección folicular, actuando directamente o modificando las funciones de las gonadotrofinas; como nos indica en la Figura N° 01.

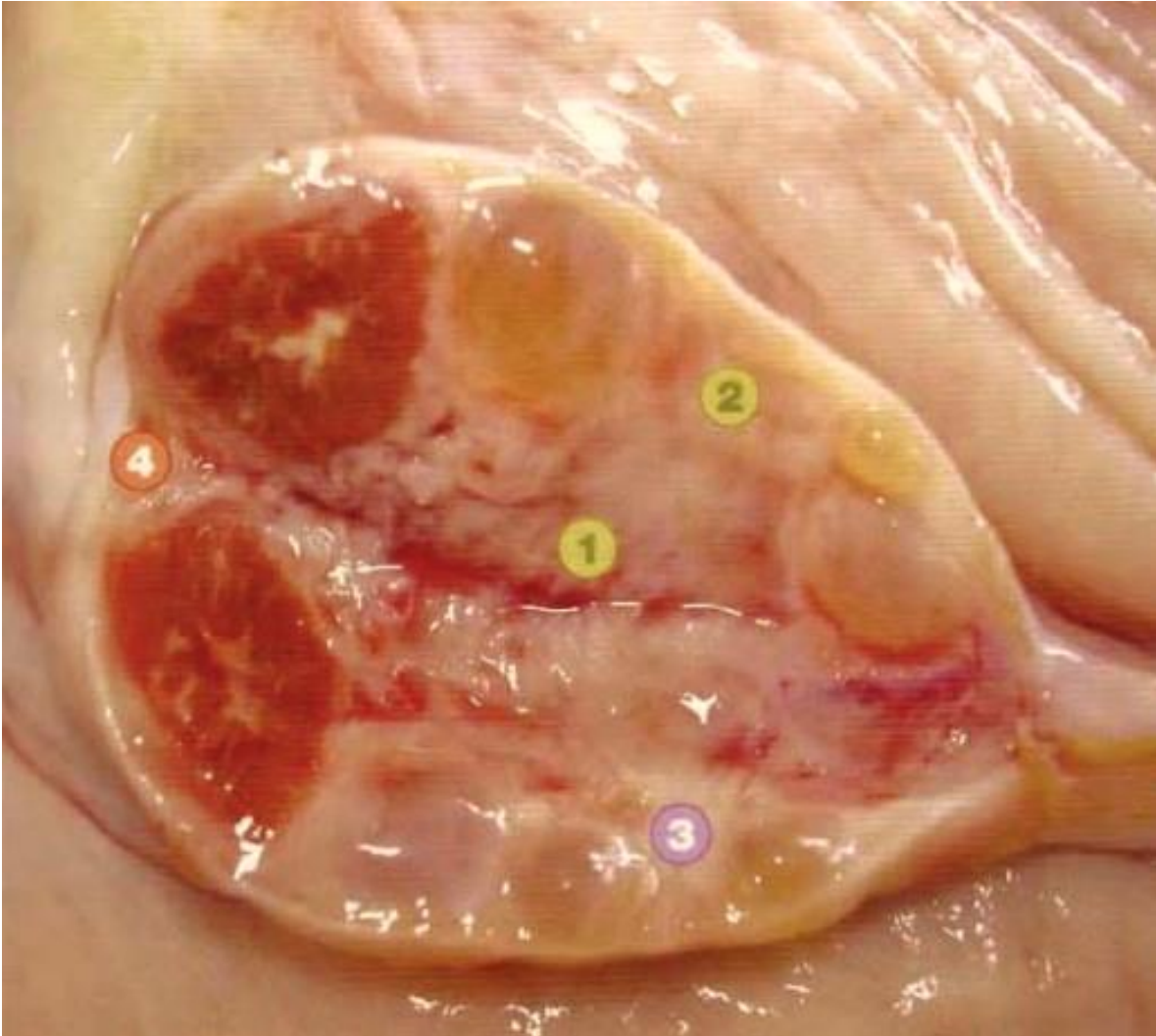


Figura N° 01 Anatomía del ovario de la vaca. El aparato reproductor de la vaca está constituido por dos ovarios está a su vez en su interior tienen las siguientes partes: región médula (1), región cortica (2), folículos (3) y cuerpo lúteo (4).

Fuente: Anatomía reproductiva de la vaca (González, 2007).

3.2.3. Maduración de los ovocitos

Los ovocitos son extraídos de folículos con diámetro entre 2 a 8 mm a través de la aspiración folicular, se coge estos diámetros porque poseen buen porcentaje de desarrollo embrionario a comparación de ovocitos extraídos de folículos menores de 2mm (García y Martínez, 2013). Después de obtener los ovocitos se seleccionan tomando en cuenta tres criterios; el diámetro de los ovocitos, el aspecto de su citoplasma y las características de las células del cúmulus que lo rodea (Liebfried y First, 1979).

El proceso de maduración *in vitro* es de gran importancia en la producción de embriones *in vitro*; porque si no se dan las condiciones adecuadas para el ovocito no madurará y por tanto no podrá ser fecundado (Gilchrist y Thompson, 2007).

La evaluación de la maduración de los ovocitos se da mediante la observación de algunas características como son la expansión de las células del cúmulus y la presencia del corpúsculo polar; otro factor importante para la maduración, es el medio de cultivo, ya que este debe proveer fuentes energéticas, proteicas, minerales, antibióticas y hormonales para un buen desarrollo de los ovocitos (Memili *et al.*, 2007).

Algunos factores a tener en cuenta en la maduración es la osmolaridad, pH y hormonal, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), estrógenos (estradiol), células somáticas para co-cultivo (células del cúmulus, granulosa, teca interna, oviducto, útero, células del hígado de rata búfalo), aminoácidos, factores de crecimiento, suero de vaca en estro, suero fetal bovino (BFS) y suero albumina bovina (BSA), (Gordon y Lu, 1990).

El medio M-199 es el que generalmente se emplea en la maduración de ovocitos, y normalmente está suplementado con gonadotropinas (FSH/LH), estradiol, suero sanguíneo y piruvato, el cual da altas frecuencias de maduración nuclear y expansión del cúmulus cuando se agrega FSH (Liebfried *et al.*, 1986). Además, el piruvato sódico permite prescindir de las células del cúmulus durante la maduración, puesto

que se han obtenido blastocistos competentes para producir terneros viables tras la transferencia embrionaria utilizando este compuesto (Geshi *et al.*, 2000).

3.2.4. Fecundación y capacitación espermática

La fecundación consiste en unir e incubar en un medio suplementado con fuentes energéticas y proteicas, ovocitos maduros con espermatozoides móviles y capacitados por un periodo entre 6 a 24 horas. La capacitación espermática se realiza mediante la exposición de espermatozoides vivos a concentraciones de heparina y cafeína, entre otras. A través de estas sustancias el espermatozoide logra capacitarse para poder interactuar y fecundar el ovocito de manera satisfactoria (Hemández, 2005). La Figura N° 02 nos indica las partes del espermatozoide.

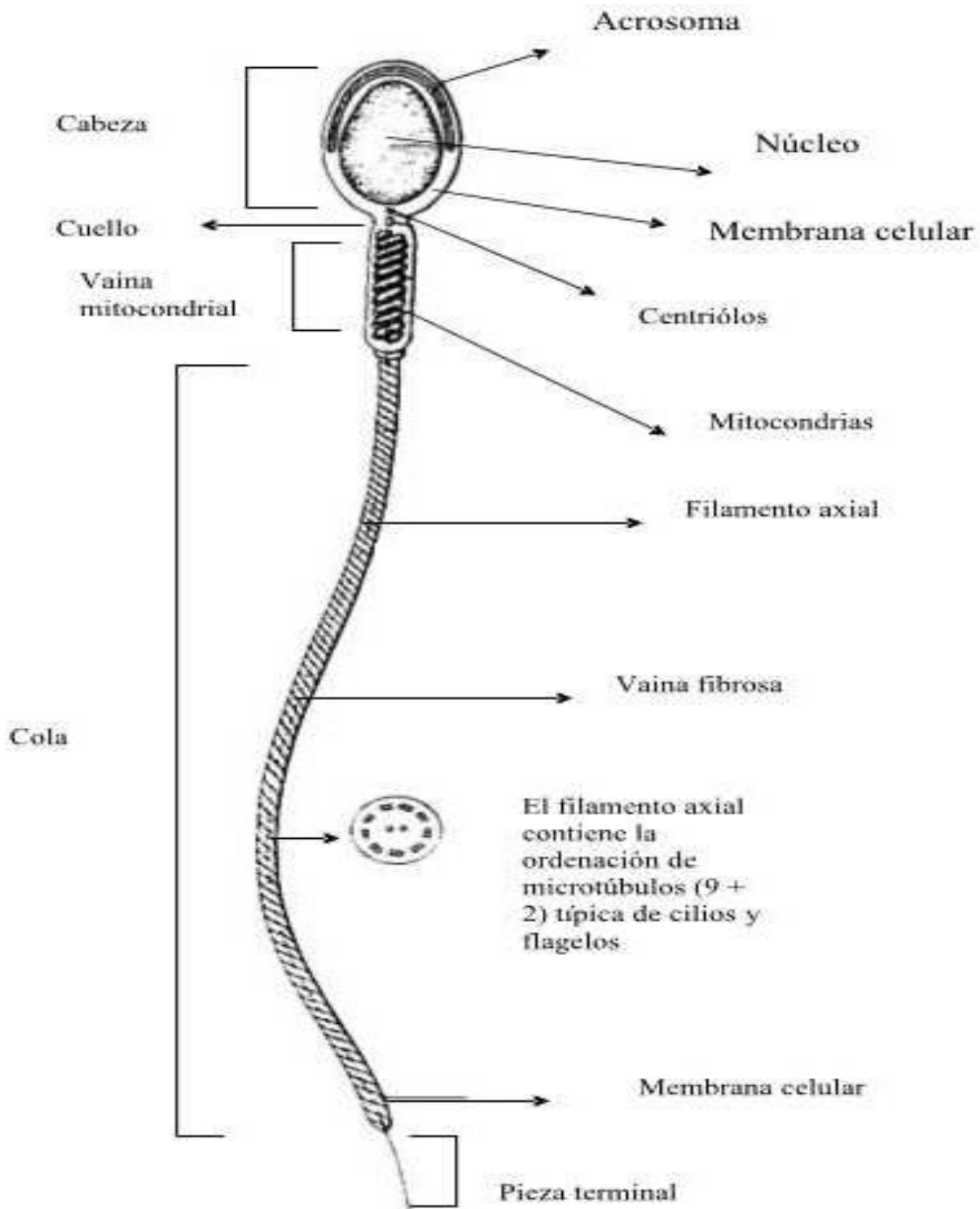


Figura N° 02 Características del espermatozoide bovino.

Fuente: Hidalgo *et al.*, 2005.

3.2.5. Mitomicina C

Es un antimetabolito derivado del *Streptomyces caespitosus* que inhibe la síntesis del ADN y proteínas. Se ha usado como coadyuvante en las cirugías de glaucoma y cirugía refractiva de forma eficaz, y demostrado que inhibe la migración de células fibroblásticas, disminuye la producción de matriz extracelular e induce la apoptosis de los fibroblastos. Su acción es considerada radiomimética (Akpek *et al.*, 2009).

3.3. Definición de términos básicos

A. Oviducto

El oviducto no es simplemente un conducto por donde pasan los ovocitos y espermatozoides, sino que además proporciona el medio ambiente adecuado para los gametos y cigotos en desarrollo gracias a su fluido luminal y al fluido oviductal (Beier, 1974).

El oviducto de los mamíferos es una estructura especializada y asume las funciones fundamentales en el proceso de transporte de espermatozoides, fertilización, ovulación y transporte de embriones hacia el cuerno uterino manteniendo viables y dirigiendo al útero. Las investigaciones han sugerido que cuando los espermatozoides llegan al istmo se adhieren a las paredes. Durante ese periodo ocurren cambios fisiológicos a las paredes espermáticas, los cuales son esenciales para que los espermias puedan fertilizar el óvulo. Estos cambios son llamados capacitación y aparentemente son regulados por la adherencia a las paredes del istmo. Tarda aproximadamente cinco a seis horas al momento de la inseminación, para que en el istmo haya una población espermática capacitada para ejercer la fertilización. La porción más alta del oviducto, cercana al ovario, es llamada ámpula. El diámetro interno del ámpula es adecuado para el paso del óvulo, es mayor que el istmo y es donde ocurre la fertilización. Se cree que una señal química realizada al momento de la ovulación, estimula la liberación de los espermatozoides de las paredes del istmo, permitiéndoles continuar su transporte al sitio de la fertilización en el ámpula (Jarnette y Nebel, 2007), como se muestra en la Figura N° 03.

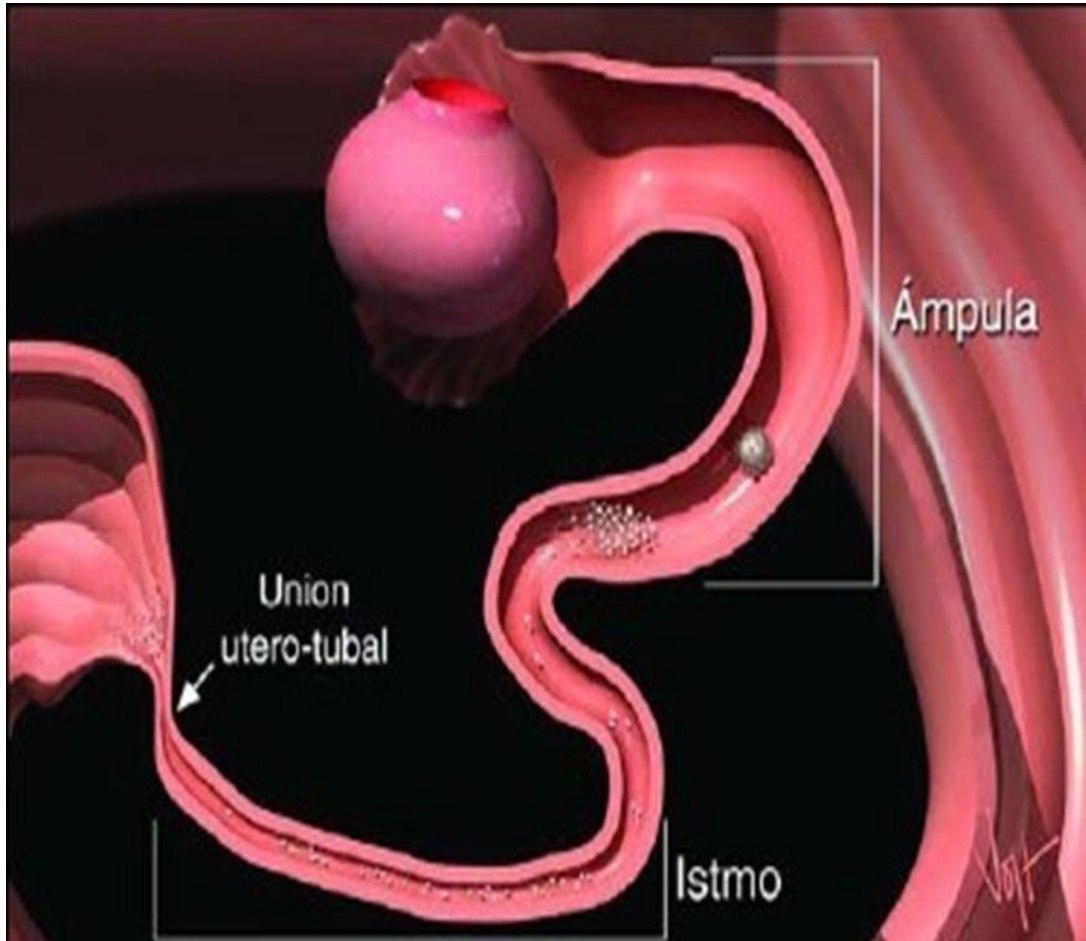


Figura N° 03 Anatomía del oviducto bovino.

Fuente: Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina (González, 2007).

B. Células epiteliales de oviducto bovino

Están profundamente involucradas en el desarrollo reproductivo y acontecimientos que ocurren en el oviducto.

C. Folículo ovárico

Un folículo ovárico es un pequeño elemento en forma de bolsa en la que el ovocito es almacenado hasta su maduración y su liberación. El desarrollo de folículos ováricos ≥ 5 mm ocurre en ondas, con dos o tres ondas por ciclo estral (McGee y Hsueh, 2000).

D. Células alimentadoras (feeder layer)

La capa de células de alimentación no siempre se deriva de fibroblastos. Las células alimentadoras suministran metabolitos a las células que soportan, no crecen ni se dividen y pueden ser inactivadas por irradiación gamma. Las células alimentadoras consisten en una capa de células incapaces de dividirse y que proporciona secreciones extracelulares para ayudar a que proliferen otras células. Difiere de un sistema de cocultivo porque solo un tipo de célula es capaz de proliferar (Sara *et al.*, 2015).

E. Cultivo *in vitro*

La técnica o proceso de mantener, cultivar células o tejidos derivados de un organismo vivo en un medio de cultivo es realizado sobre un medio nutritivo en condiciones estériles (Menezó y Khatchadourian, 1991).

F. Mitomicina C

Akpek *et al* (2009); nos explica que la Mitomicina C es un antibiótico antineoplásico metilazirinopirrolindoleidona aislado de la bacteria *Streptomycescaesпитosus* y otras especies bacterianas de *Streptomyces*. La Mitomicina C genera radicales de oxígeno, alquila ADN y produce enlaces cruzados entre el ADN interconectado e inhibiendo así la síntesis de ADN. Preferentemente tóxica para las células hipóxicas, la Mitomicina C también inhibe la síntesis de ARN y proteínas a altas concentraciones.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

El presente trabajo de investigación contó con dos fases.

- a. Fase exploratoria: Los embriones fueron generados por el método FIV; el procedimiento para cada método se encuentra establecido por el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. La definición del protocolo, fue de acuerdo a los procedimientos generales definidos para el desarrollo de los embriones.
- b. Fase experimental: Las muestras fueron trabajadas en el Laboratorio de Biotecnología Animal, siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio para la obtención del feeder layer, congelación del feeder layer, obtención y selección de los ovocitos, maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*, inactivación del feeder layer y co-cultivo con feeder layer.

4.2. Métodos

4.2.1. Recolección de muestras

Se recolectó las muestras en el Camal Municipal del distrito de Chachapoyas-Chachapoyas- Amazonas, y centro de evaluación en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Amazonas está situada en el nororiente del país, posee parte de sierra y de selva. Limita al norte con Ecuador; al este con Loreto; al sudeste con San Martín; al sur con La Libertad; y al oeste con Cajamarca. Su relieve andino está formado por la llamada Cordillera del Cóndor (oriental de la cordillera de los Andes). Su superficie de 39.249 km², sus coordenadas son 2° 59' de latitud sur y se encuentra entre el meridiano 77° 9' y 78° 42' de longitud oeste.

4.2.2. Recolección de líneas celulares.

Se recolectó un aparato reproductivo sano, con una actividad reproductiva (ciclando), la cual fue obtenida del beneficio bovino de la raza criollo, del camal municipal de Chachapoyas. Posteriormente, éste fue trasladado al Laboratorio de Biotecnología Animal, para realizar la identificación de los dos conductos lineales del oviducto (ámpula e istmo) y el reconocimiento de los diferentes segmentos de oviductos se realizó considerando variaciones en el diámetro del oviducto.

4.2.3. Obtención del feeder layer

Se utilizó el aparato reproductivo de una hembra bovina que presentó ovarios con folículos dominantes que se recuperó después del beneficio bovino del camal de Chachapoyas. Se trasladó al Laboratorio de Biotecnología Animal, luego se realizó la identificación de los dos conductos lineales del oviducto (istmo e ámpula), el reconocimiento de los diferentes segmentos del oviducto se realizó considerando las diferencias anatómicas. El segmento amprial del oviducto tiene mayor diámetro que el ístmico. Los dos tejidos conectivos de los segmentos fueron recortados del oviducto seleccionado. Cada extremo del oviducto fue envuelto firmemente por una sutura quirúrgica estéril. Se prosiguió a lavar y desinfectar con etanol cada segmento del oviducto individualmente, de cada segmento cortado, se sacó la capa externa y solo la capa interna se colocó en placa Petri dentro de la cabina de bioseguridad, donde se realizó una digestión mecánica, para posteriormente lavar el tejido procesado varias veces en buffer fosfato salino (PBS) con antibióticos y someterlo a digestión enzimática por 18 h en 10 ml de colagenasa (1 mg/ml en medio DMEM-F12 suplementado con antibióticos-antimicóticos y 10% SFB) a 37°C y con agitación orbital. Luego se agitó vigorosamente para desprender células que aún pudieran encontrarse adheridas al mismo. Se dejó reposar por 3 min y se recuperó el sobrenadante, siendo sembrado en placas petri de 35 mm estériles. El volumen del cultivo se completó a 2 ml con medio DMEM-F12 suplementado con 1 mM de glutamina, 0.2 mM de piruvato, 10 ng/ml de EGF (epidermal growth factor) y 30%

de suero fetal bovino (SFB) y fue puesto en una incubadora de CO₂ a 38°C para el desarrollo de las células.

4.2.4. Congelación del feeder layer

Cuando el crecimiento de las células había llenado toda la placa de cultivo, se identificó aquellas placas donde las células tuvieron rápida división como se observa en la siguiente Figura N°04 (B y D). Luego uno o dos días antes de la congelación se cambió medio fresco al cultivo. Para el proceso de congelación se sacó todo el medio de cultivo de las placas con células y se lavó varias veces con PBS luego se agregó tripsina-EDTA al 0.025% para despegar las células crecidas, posteriormente se inactivó la tripsina adicionando DMEN F12 suplementado con 10% SFB. Cuando las células estuvieron despegadas, se centrifugó todo el contenido en tubos de 15ml por 2500rpm por 5 minutos, para después coger el pelet y colocarlo en una placa de 60mm en medio DMEN F12 suplementado con 10% de SFB y 8% de DMSO (dimetil sulfóxido), luego se colocó a razón de 1ml en viales Nalgene de 2ml (Nalgene, Dinamarca) a una concentración de 3x10⁶ células/ml. La congelación se llevó a cabo mediante un gradiente de -1C°/min, empleando el sistema Mister Frosty (Nalgene, Dinamarca) en el interior de un congelador comercial de -80°C. Luego de 4 horas los viales fueron introducidos a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C).

4.2.5. Recolección de ovarios

Se transportaron ovarios de bovino, cruce de criollo con brown swiss del centro de beneficio de Chachapoyas-Amazonas, en un recipiente isotérmico conteniendo cloruro de sodio al 0.9% (wt/vol) con 1ml de gentamicina, temperado a 37°C. En el laboratorio, los ovarios fueron nuevamente lavados en cloruro de sodio al 0.9%. Luego, se aspiraron los ovocitos usando una jeringa de 10ml y una aguja de 18 G con medio de manipulación HEPES suplementado con 50 mg/ml de gentamicina y 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB) (Vajta *et al.*, 2001).

4.2.6. Maduración *In Vitro* (MIV) de ovocitos.

Los ovocitos aspirados fueron clasificados según la presencia y calidad de las células del cúmulus, coloración y forma del ovocito (Liebfried y First, 1979; Sato *et al.*, 1990). Luego fueron cultivados *in vitro* por 24 h en una atmósfera humificada con 6% CO₂ a 38.5 °C, en placas multi pocillos de 4 celdas en medio de maduración TCM-199 suplementado con 0.25 mg/ml de piruvato de sodio, 50 ug/ml de gentamicina, 0.01UI/ml de hormona folículo estimulante (FSH), 0.01UI/ml de hormona luteinizante (LH), 0.1mg/ml de glutamina, 10ng/ml factor de crecimiento epidermal (EGF), 1ug/ml de 17β-estradiol y 10% SFB. Como se muestra en la Figura N° 06.

4.2.7. Fecundación *In Vitro* (FIV) de ovocitos

Pasada las 24 horas de maduración los ovocitos fueron juntados en una incubadora por 18 horas en una atmósfera humificada a 38 °C y 5% CO₂ con los espermatozoides lavados, seleccionados y capacitados por el método de Percoll (Parrish *et al.*, 1995) de la raza brangus en medio de fecundación TALP-FIV (Vajata *et al.*, 2001), suplementado con 2mM de piruvato de sodio, 50 ug/ml de gentamicina, 0.03 mg/ml heparina y 3 mg/ml de BSA-FAF.

4.2.8. Inactivación del feeder layer.

Se descongeló células del istmo y ámpula bajo inmersión en baño maría a 37 °C, las cuales se plaquearon en placas de cultivo de tejidos, donde al llegar las células al 90% de confluencia se inactivaron mediante incubación en una atmosfera humificada a 38.5°C y 5% CO₂ con 40 µg/ml de Mitomicina C (MCC) durante 5 horas, respectivamente. Después de la inactivación, se retiró el medio que contenía las placas y las células se lavaron dos veces con PBS, para luego ser disociadas con tripsina-EDTA al 0.025%, posteriormente se inactivó la tripsina adicionando DMEN F12 suplementado con 10% SFB. Cuando las células estuvieron despegadas e inactivadas se sembraron en Placas de 4 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), a una densidad 1,44 x 10⁵ células/pocillo, respectivamente (Gómez *et al.*, 2010) en medio

DMEN F12. Posteriormente a las 24 horas de cultivo se sacó el medio DMEN F12 y se reemplazó con el medio SOF base (Vajata *et al.*, 2001) suplementado con 0.044 g/l de piruvato de sodio, 0.039 g/l de L-glutamina, 3.0 mg/ml de Suero Albumina Bovina (BSA-FAF), 1X de aminoácidos esenciales, 1X de aminoácidos no esenciales, 10 mg/ml de EGF, 0.1 mg/ml de ácido cítrico, 0.5 mg/ml de myo-inositol, 50 ug/ml de gentamicina y 2 % de SFB donde permanecieron mínimo 2 horas antes de poner los embriones para su respectivo cultivo. Como nos muestra en la Figura N° 4 (A y C), la inactivación de las células.

4.2.9. Co-cultivo de embriones con feeder layer

Pasadas 18 horas de fecundación los presuntos cigotos fueron desnudados por pipeteo y colocados en las placas de 4 pocillos que contenían las células inactivadas del ámpula (grupo **CAB**), istmo (grupo **CIB**), ambas (**CB**) y sin co-cultivo (grupo control **SCB**) en el medio de cultivo SOF mencionado anteriormente. Luego fueron incubadas a 38.5°C, 90 % de humedad y mezcla de gases (90% N, 5% CO₂, 5% O₂) en bolsas herméticas. Como se muestra en la Figura N° 09 (A, B, C Y D).

4.2.10. Análisis estadístico

Para determinar si existe o no diferencia entre el porcentaje de embriones que fueron co-cultivados con el sistema feeder layer y el sistema tradicional, se utilizó la prueba de homogeneidad de varianzas (ANOVA) y la prueba T-student al 5% para las muestras. Las muestras por cada repetición fueron menores a 30. La prueba se realizó con el programa SPSS.

V. RESULTADOS

La Tabla N° 01 muestra ovocitos maduros que fueron examinados y sometidos al proceso de MIV, después de las 24 horas de inicio del proceso de maduración, resultó que el 42%, 61%, y 64% lograron llegar a la metafase de la segunda división meiótica. Sin embargo, el 58%, 39% y 36% resultaron degenerados. También se observó la expansión de las células del cúmulus de los ovocitos (Figura N° 06). Paralelamente se realizó la inactivación de las líneas celulares con Mitomicina C por 5h como nos indica la Figura N° 04 (B y C), este proceso se realizó cuando las líneas celulares estaban desarrolladas (Figura N° 04; A y C)

La fertilización fue realizada con pajillas del semental de la raza Brangus (Impacto) provenientes del banco de la estación experimental de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas-Chachapoyas; lo mismo que los resultados de los presuntos cigotos que fueron co-cultivados con el sistema feeder layer (**CAB, CIB y CB**) comparados con el sistema tradicional (**SCB**). Se obtuvo 30%, 26,9% y 26,5% de blastocistos para CAB, CIB, CB y SCB; respectivamente (Tabla N° 02). El co-cultivo con las células del ámpula (CAB) así como, la combinación de ambas (CB), promovieron mayor número de embriones comparado a los grupos de CIB y SCB.

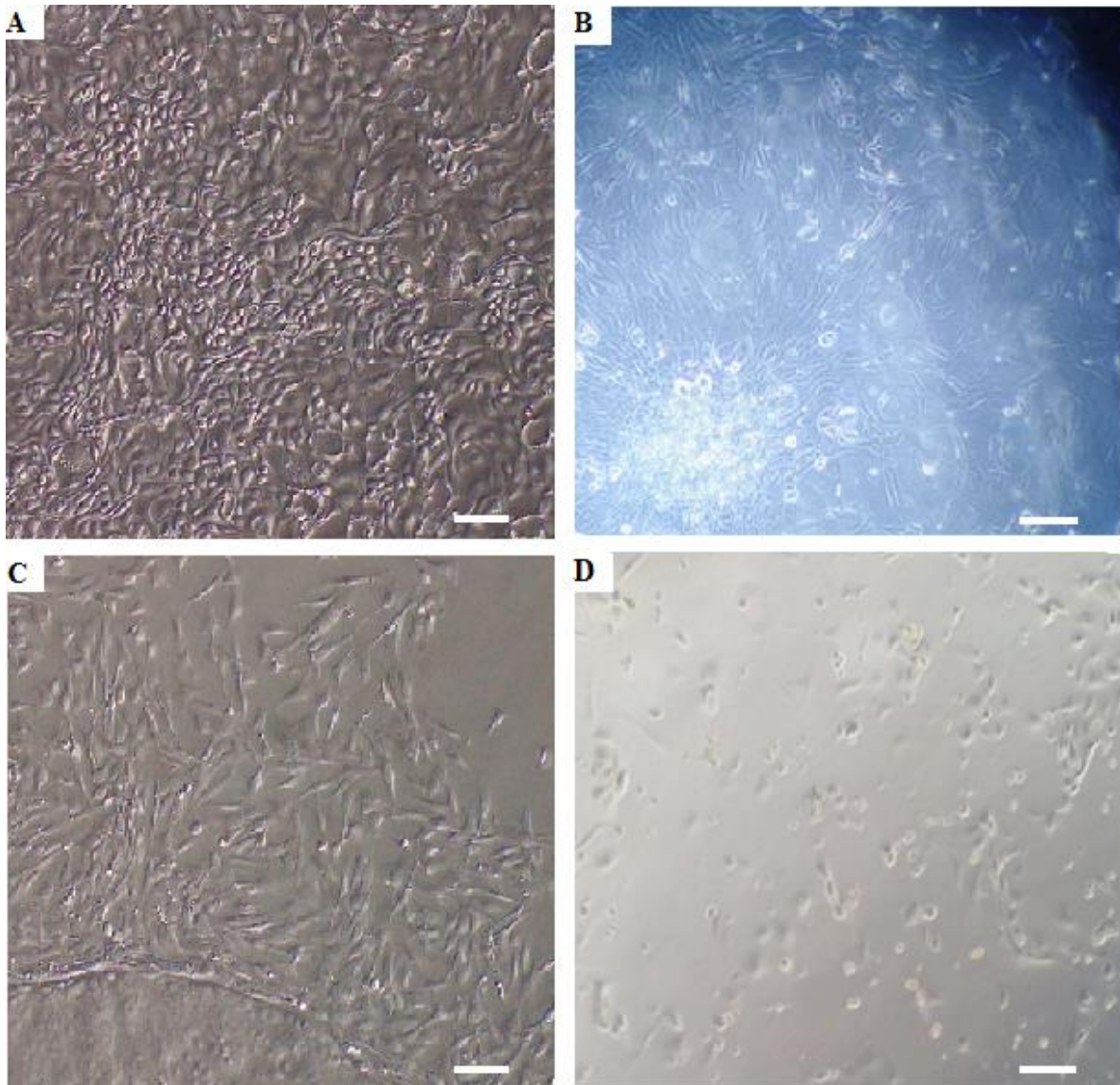


Figura N° 04 Líneas celulares del ampulla y el istmo. Células del ampulla (A) y del istmo (C), fueron colectadas del oviducto bovino e inactivadas con Mitomicina C por 5h. Se observó que las células inactivadas del ampulla (B) y del istmo (D), no continuaron proliferando y permanecían en la base de la celda de cultivo. La barra indica 60 μm .

Tabla N° 01 Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.

MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>						
# Ovocitos clasificados	Maduración	% Maduración	Promedio Madurados	Degenerados	% Degenerados	Promedio degenerados
76	32	42	55.7	44	58	44.3
100	61	61		39	39	
100	64	64		36	36	

Se observa el total de ovocitos que formaron parte de tres muestras examinadas y sometidas al proceso de MIV. Luego de las 24 horas de inicio del proceso de maduración, se obtuvo el 42%, 61%, y 64% en metafase de la segunda división meiótica. También se observa el 58%, 39% y 36% de los ovocitos que no llegaron a madurar, se degeneraron a lo largo de proceso. Asimismo, se puede apreciar que los ovocitos al final de la maduración presentaron una expansión de CC, pero tan solo algunos llegaron a madurar y presentaron expulsado el primer crepúsculo polar.

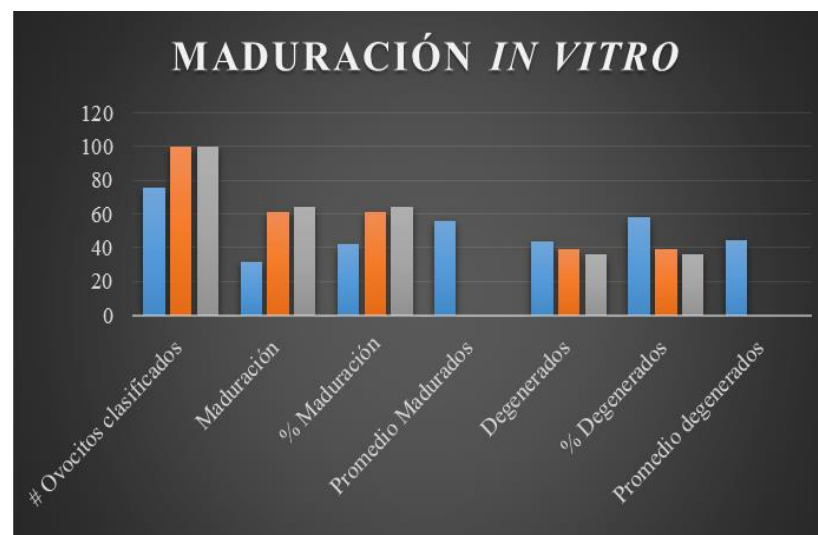


Figura N°05 Porcentaje de maduración *in vitro*.

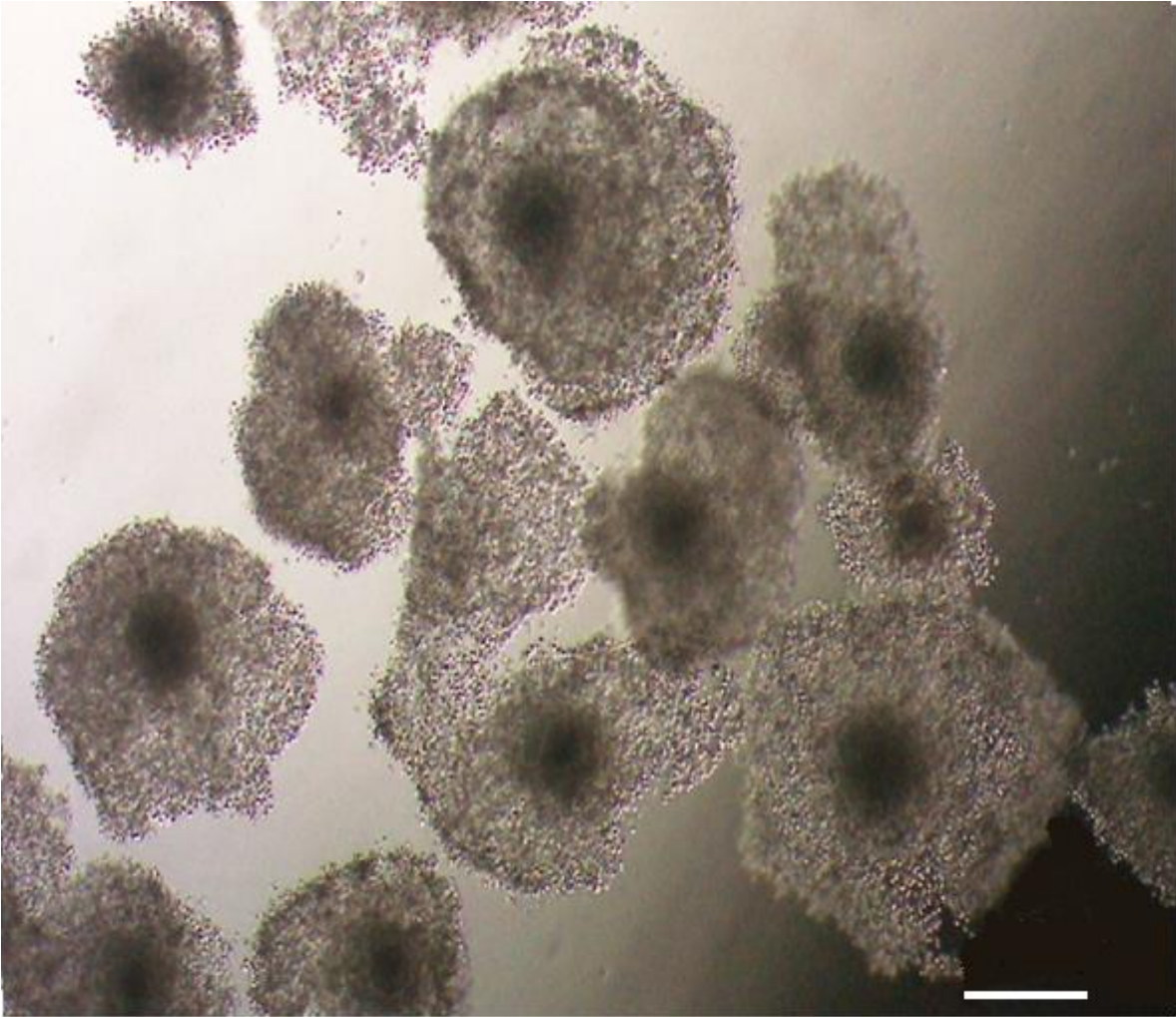


Figura N° 06 Expansión de las células del *cúmulus oophorus*. La figura nos muestra la expansión de las *cúmulus* con 2 a 4 capas, posterior a las 24 horas de MIV. Los ovocitos fueron obtenidos de folículos de 2-7 mm. La barra indica 100 μ m.

Tabla N° 02 Co-cultivo *in vitro* de embriones bovinos.

GRUPO	N° ovocitos	N° ovocitos madurados (%)	N° ovocitos fecundados	N° ovocitos cultivados	N° Embriones (%)
CAB	500	280(56) ^a	280	272	84 (30.0 ± 2.3) ^a
CIB	500	278(55.6) ^a	278	272	75 (26.9 ± 2.2) ^b
CB	500	279(55.8) ^a	279	272	82 (29.4 ± 2.2) ^a
SCB	500	275(55) ^a	275	272	73 (26.5 ± 2.2) ^b
Total	2000	1112	1112	1088	314 (28.2)

La producción *in vitro* de embriones bovinos entre los co-cultivo en sistema “feeder layer” con células CAB, CIB, CB y SCB fueron 30%, 26.9%, 29.4% y 26.5% respectivamente, El desarrollo embrionario se evaluó a los 7 días de cultivo pos fecundación ($p < 0.05$). * Nos indica el % de embriones obtenidos en co-cultivo con sistema feeder layer y el % de embriones cultivo tradicional. Dónde: Célula ámpula bovino (CAB), célula istmo bovino (CIB), célula ámpula e istmo bovino (CB) y sin células bovino (SCB).

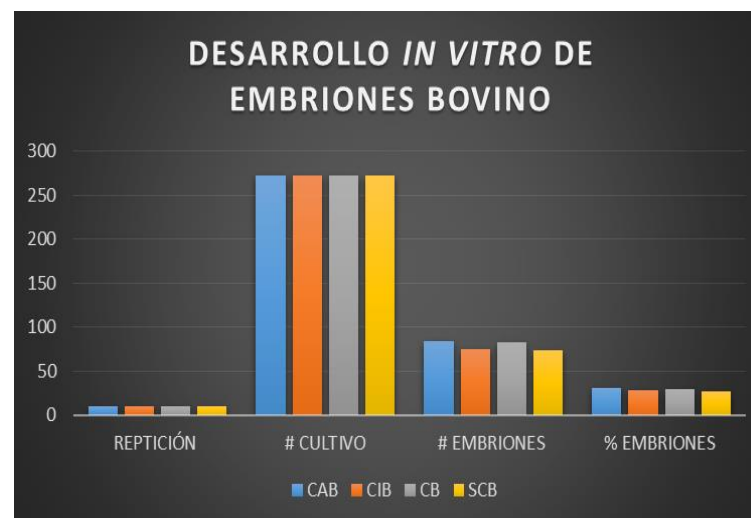


Figura N° 07 Desarrollo *in vitro* de embriones bovinos.

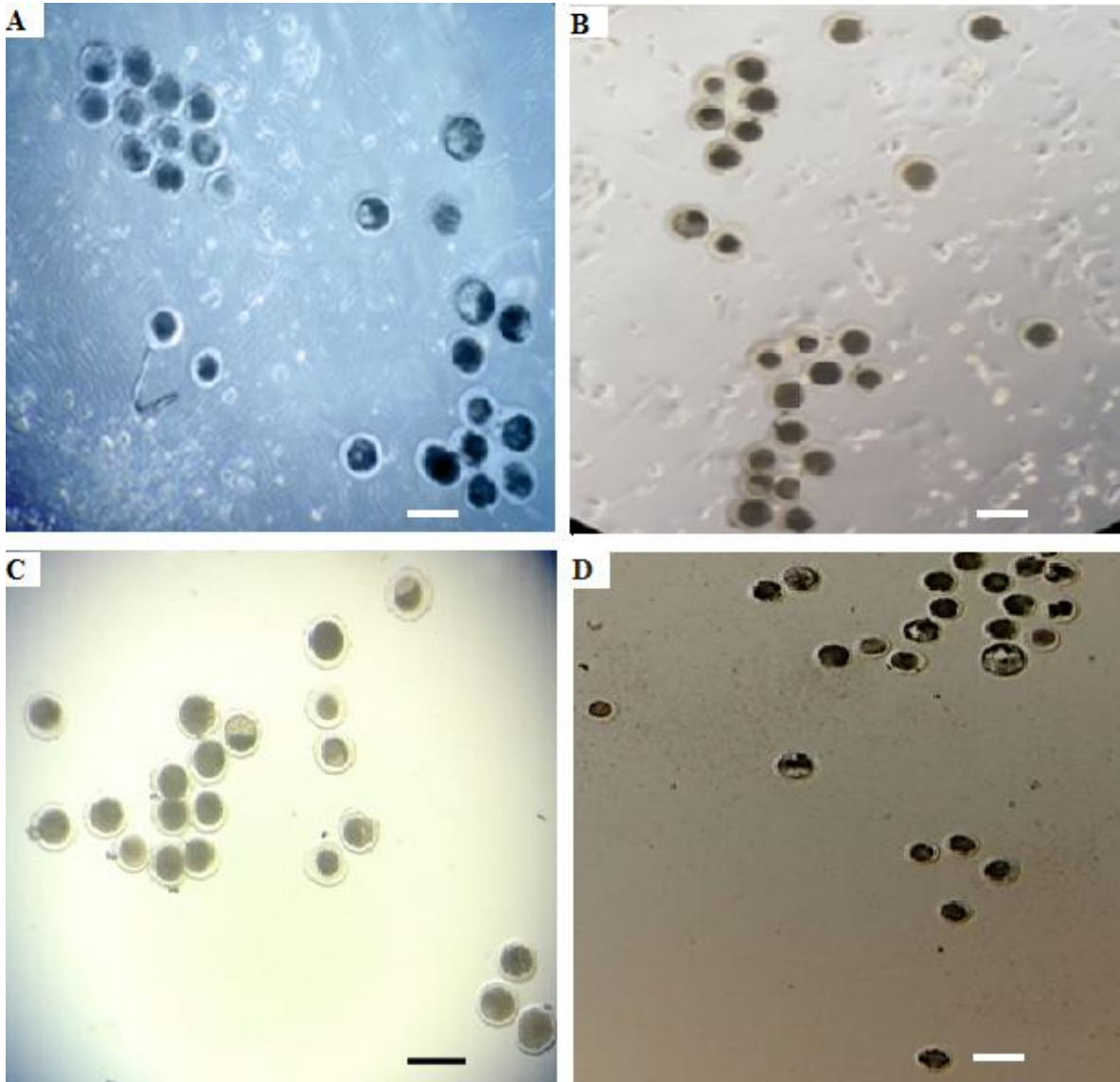


Figura N° 08 Blastocisto co-cultivados con el sistema feeder layer y sistema tradicional. Los cigotos fueron co-cultivados por siete días hasta la obtención de Blastocitos con líneas celulares del ampulla (A) y del istmo (B), y grupo control (C y D). La barra indica 50 μ m.

VI. DISCUSIONES

En el trabajo de investigación, el porcentaje de embriones producidos bajo el sistema de co-cultivos con células alimentadoras inactivadas (ámpula e istmo) fue de 30% al séptimo; similar a lo reportado por Dashti *et al* (2016), quienes obtuvieron un 29% de tasa de desarrollo embrionario al séptimo día de co-cultivo con células del oviducto. Estos valores demuestran que el sistema de co-cultivo tiene resultados semejantes a los co-cultivos convencionales hallados por otros autores (Mucci *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en este estudio de investigación con co-cultivo de CAB, CIB y SCB fue de 30%, 26.9% y 26.5%, respectivamente, valores semejantes a lo reportado por Hamdi (2013), quien obtuvo 24.1% de blastocistos bajo un sistema de co-cultivo con células epiteliales oviductuales. Por otro lado, Dashti *et al* (2016) obtuvieron 40.62%, 30.52% y 22.52%, los blastocitos co-cultivados con células epiteliales del ámpula, istmo y sistema tradicional, respectivamente. Estos valores reportados sugieren que el uso de células somáticas (células oviductuales, células de granulosa, vesículas trofoblásticas; etc) permiten el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto (Rizos, 2001; Mermillod *et al.*, 2010).

La MMC es un tratamiento que utiliza para las células alimentadoras ya que ha demostrado modificar la expresión o patrón secretor de diversos factores de crecimiento (Eiselleova *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012). En la presente investigación, se utilizó Mitomicina C (MMC) como inactivador de las células alimentadoras, con protocolos similares a los empleados por Mehtab *et al* (2017). El protocolo demostró tener efecto inhibitorio sobre las células somáticas, traduciéndose en la obtención de feeder layer con efecto positivo sobre la producción de embriones *in vitro*.

VII. CONCLUSIONES

- El porcentaje de maduración *in vitro* obtenido en este experimento (64%), nos confirma que los ovocitos cosechados tienen aptitud para el reinicio de la meiosis.
- El uso de co-cultivo con líneas celulares procedentes del ampulla, tuvo mayores porcentajes de embriones producidos *in vitro*, comparados a aquellos provenientes de las del istmo (30% y 26.9%, respectivamente). Sin embargo, se observaron diferencias significativas de este último comparados al del control (26.5%).
- Una línea celular oviductual brinda soporte durante el desarrollo embrionario *in vitro* bovino.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar los sistemas de co-cultivo en la producción *in vitro*, ya que brindan estímulo para el desarrollo del embrión.
- Utilizar líneas celulares del ampulla e istmo en el sistema de co-cultivo, porque se obtienen blastocistos viables.
- Determinar los efectos de diferentes líneas celulares (germinales, somáticas, etc.) durante los procesos de maduración y desarrollo embrionario *in vitro*.
- Prevenir la contaminación de los cultivos durante cada fase de la producción de los embriones.
- Realizar sistemas de co-cultivos en otras especies de animales domésticos.
- Preclasificar los ovarios y folículos a aspirar, para obtener ovocitos de buena calidad.
- Continuar con las investigaciones relacionadas al uso de los co-cultivos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akpek, E. D., Kalayci, D., & Hasiripi, H. (2009). Postoperative topical mitomycin C in conjunctival squamous cell neoplasia. *Cornea*, 18: 59-62.
- Arvelo, F., Pérez, P., & Cotte, C. (2004). Obtencion de láminas de piel humana medinte ingeniería de tejidos. *ACV*, 55 (1), 74-82.
- Avilés, M., Gutiérrez, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod*, 16, 896-906.
- Beier, H. M. (1974). Oviductal and uterine fluids. *J Reprod Fertil*, 37:221-237.
- Besenfelder, U., Havlicek, V., & Brem, G. (2012). Role of the oviduct in early embryo development. Reproduction in domestic animals. *Zuchthygiene*, 47 Suppl 4, 156-163.
- Blandau, R. J. (1980). *In vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*, vol. 33 (3-11).
- Boland, M. P. (1980). The use of rabbit oviduct as a screening tool for the viability of ma alian eggs. *Theriogenology*, 126-137.
- Brackett, B. G., & Col. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod*, 27: 147-158.
- Camous, S., Heyman, Y., & Meziou, W. (1984). Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod.Fertil*, 72: 479-485.
- Coy, P., Crullon, L., Canovas, S., Romar, R., Matas, C., & Aviles, M. (2008). Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction*, 135, 19-27.
- Dashti, Saeed, Zare, S., Ahmad, Kohram, Hamid, & Navid. (2016). Differential influence of ovine oviduct ampullary and isthmic derived epithelial cells on *in vitro* early embryo

development and kinetic. *Small ruminant. Research* <http://dx.doi.org/10.1016/j.Smallrumeres>.

Eiselleova, L., Peterkova, I., Hampl, A., & Dvorak, P. (2008). Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.*, 52: 353-363.

Ellington, J. E., Carney, E. W., Farrell, P. B., Simkin, M. E., & Foote, R. H. (1990). Bovine 1-2-cell development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod.*, 43:97.

Eyestone, W. H., Northey, D. L., & Leibfried, M. L. (1985). Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.*

Fernández, A. (1996). Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmorten. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela. 87.

Gandolfi, F., & Moor, R. (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.*, 81:23-28.

García, J., & Martínez, J. L. (2013). Implementación de un protocolo de fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano.

Gardner, J., Simmons, M., & Snustad, P. (2000). *Principios de genética*. Mexico DF: 4a ed.: Limusa S.A. de C.V.

Geshi, M., Takenouchi, N., & Nagai, T. (2000). Effect of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biology of reproduction*, 63: 1730-1734.

Gilchrist, R., & Thompson, J. (2007). Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, 67:6-15.

- Gómez, M., Serrano, M., Earle, C., & Jenkins, J. (2010). Derivation of cat embryonic stem-like cells from *in vitro*-produced blastocysts on homologous and heterologous feeder cells. *Derivation of cat Theriogenology*, 7:498-515.
- González, K. (2007). Anatomía reproductiva de la vaca. *Disponible en: <https://zoovetespasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/anatomia-reproductiva-de-la-vaca/>*.
- Gordon, I., & K, H. (1990). Production of embryos *in vitro* and it's impact on livestock production. *Theriogenology*, 33:77-87.
- Greenwald, G. S. (1972). Of eggs and follicles. *En American Journal of Anatomy*, 135:1-4.
- Gutierrez , C. (2010). El mercado de los embriones. *Disponible en: <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-7730302>*.
- Gutteridge, J. M., Quinlan, G. J., & Wilkins, S. (1984). Mitomycin C-induced deoxyribose degradation inhibited by superoxide dismutase. *A reaction involving ron, hydroxyl and semiquinone radicals. FEBS Lett*, 167:37.
- Hamdi, M. (2013). *Efecto de las células epiteliales del oviducto bovino y de sus vesículas extracelulares en el cultivo ebrionario bovino in vitro. Tesis de Maester*. Valencia.
- Hansen, P. J. (2006). Realizing the promise of IVF in cattlean overview. *Theriogenology*, 65:119-125.
- Hemández, H. F. (2005). Fecundación *in vitro*. *Disponible en: URL: http://avpa.ula.Ve/docuPDFs/libros_online/manualganaderiaseccion8/articulo4-s8.pdf*.
- Heyman, Y., Ménézo, Y., & Chesne, R. (1987). *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27:59-68.
- Hidalgo, C. A., Tamargo, C., & Díez, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecnología Agroalimentaria*.

- Iyer, V. N., & Szybalski, W. (1964). Mitomycins and proflomycin: Chemical mechanism of activation and cross-linking of DNA. *Science*, 145:55-58.
- Jarnette, M., & Nebel, R. (2007). Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina. *Select. Reproductive Solutions*, 1.
- Kuzan, F. B., & Wright, R. W. (1981). Attachment of porcine blastocysts to fibroblast monolayers *in vitro*. *Theriogenology*, 651-658.
- Kuzan, F. B., & Wright, R. W. (1982). Blastocyst expansion, hatching and attachment of porcine embryos co-cultured with bovine fibroblasts *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci*, 5:57-63.
- Lawson, R. A., Rowson, L. E., & Adams, C. E. (1972). The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to heifers. *J. Reprod. Fertil*, 8:313-315.
- Lee, K. F., & Yeung, W. S. (2006). Gamete/embryo-oviduct interactions: implications on *in vitro* culture. *Human fertility*, 9, 137-143.
- Leibfried, M. L., Critser, E. S., & First, N. L. (1986). Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod*, 35:850-857.
- Levitas, E., Lunenfeld, E., Har-Vardi, I., Albotia, S., Sonnin, Y., Hackman-Ram, R., & Potashnik, G. (2004). Blastocyst stage embryo transfer in patient who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective randomised study. *Fertil.Steril*, 81:567-71.
- Liebfried, L., & First, N. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci*, 48:76-86.
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21:200-14.

- Mehtb, S., Parmara, Smruti, R. M., Anjali, S., Sriti, P. G., Sai, K., . . . Taru, S. G. (2017). Expression and secretory profile of buffalo fetal fibroblasts and wharton's jelly feeder layers. *Reproductive*, 243-122.
- Memili, E., Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N. L., & Parrish, J. J. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultures in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 101:225-240.
- Menezó, Y., & Khatchadourian. (1991). The laboratory culture media. *Assist Reprod Rev*, 6:136-143.
- Mermillod, P., Vansteenbrugge, A., Wils, C., Mourmeaux, J. L., Massip, A., & Dessy, F. (1993). Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol Reprod*, 49:582-587.
- Mermillod, P., Vansteenbrugge, A., Wils, C., Mourmeaux, J. L., Massip, A., & Dessy, F. (2010). Early development of ruminant embryos autonomous process or the result of positive dialog with surrounding maternal tissues. *Acta Scientiae Veterinarie*, 38:s521-s533.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F., & Alberico, R. (2006). Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Rev. Electrónica UACH*, 38:97-102.
- Nieto, A., Cabrera, C. M., Catalina, P., Cobo, F., Barnie, A., Cortés, J. L., & Concha, A. (2007). Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. *Cell Biol Int*, 31:269-78.
- Park, J. H., Kim, S. J., Oh, E. J., Moon, S. H., Roh, S. I., Kim, C. G., & Yoon, H. S. (2003). Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod*, 69:2007-14.

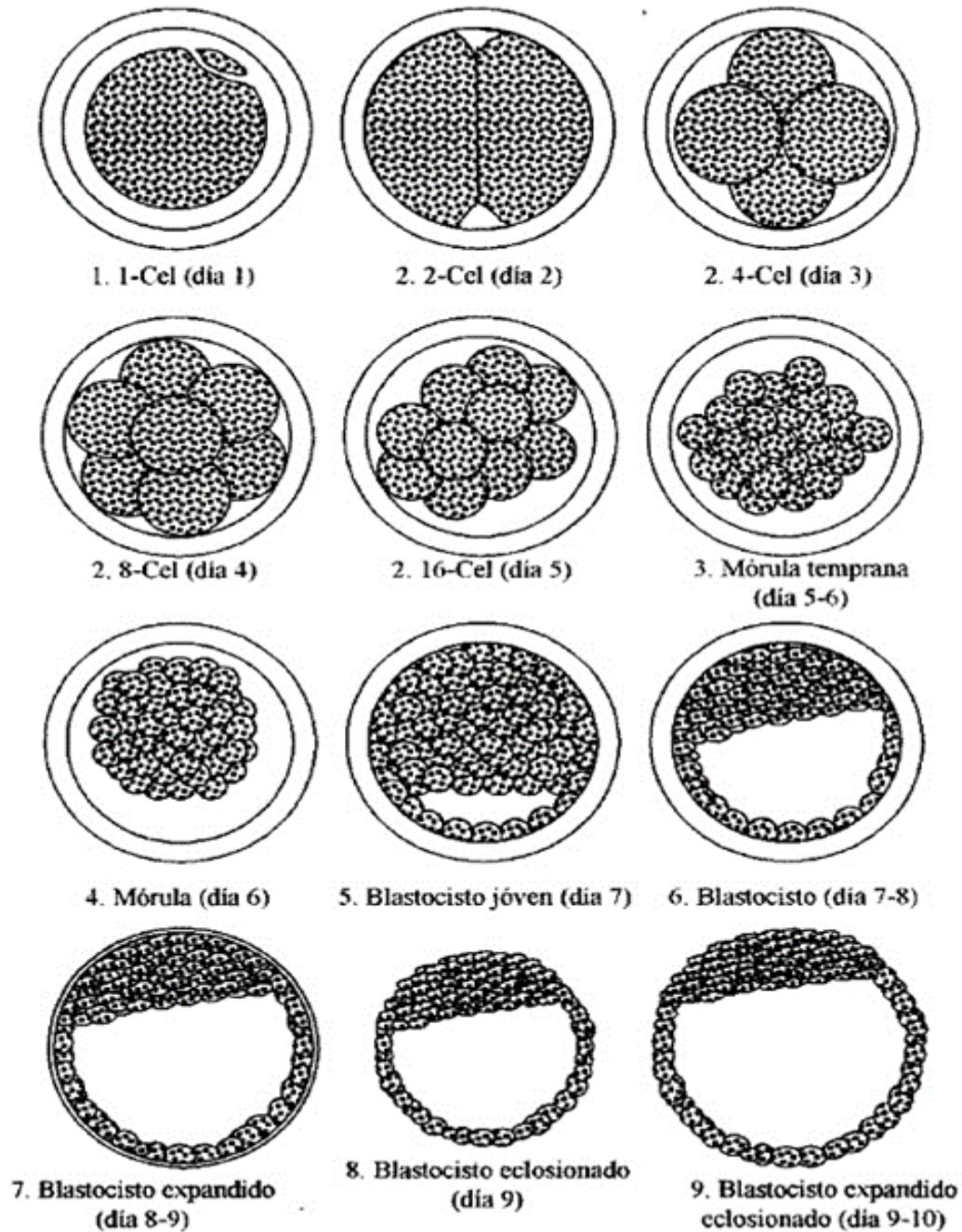
- Parrish, J. J., Krogenaes, A., & Susko, J. L. (1995). Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of *in vitro* fertilization and development. *Theriogenology*, 44:859-870.
- Pincus, G., & Enzmann, E. (1935). The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, 62:665-675.
- Pool, S. H., Rorie, R. W., Pendleton, R. J., Menino, A. R., & Godke, R. A. (1988). Culture of earlystage bovine embryos inside day-13 day-14 precultured trophoblastic vesicles. *Ann. New York Acad. Sci.*, 541:407.
- Pretty, L. (1994). *Fecundación y desarrollo embrionario temprano*. Madrid: Aedos.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., & Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nature Biotechnol.*, 18:399-404.
- Rexroad, C. (1989). Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31:105.
- Rexroad, C. E., & Powell, A. M. (1986). Co-ulture of she and cells from sheep oviduct. *Theriogenology*, 37:859.
- Rexroad, C. E., & Powell, A. M. (1988a). Co-culture of ovine eggs with oviductal cells and trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 29:387.
- Rexroad, C. E., & Powell, A. M. (1988b). Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. *J. Anim. Sci.*, 66:947.
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo, P., Fuente, J., Lonergan, P., & Gutiérrez, A. (2008). Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.*, 43 Suppl 4:44-50.
- Rizos, D., Ward, F., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2001). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development and quality. *Reprod. Doment. Anim.*, 43 Suppl4:44-50.

- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim*, 43 Suppl 4:44-50.
- Ruíz, A. F. (2016). La producción de embriones *in vitro* bovinos a nivel mundial. *Genbiogan*.
- Sara, L., Eva, G., Alvaro, M., Fernando, L., & Marcela, R. (2015). Feeder layer cell actions and applications. *Tissue Eng Part B Rev*.
- Sato, E., Matsuo, M., & Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: Improvement of meiotic competence by dibutyl cycli adenosine 3', 5' monophosphate. *J Anim Sci*, 68:1182-1187.
- Sharma, R., George, A., Kamble, N. M., Chauhan, M. S., Singla, S. K., Manik, R. S., & Palta, P. (2012). Growth factor expression pattern of homologous feeder layer for culturing buffalo embryonic stem cell-like. *Reprod. Fertil. Dev*, 24:1098-1104.
- Smith, G. (2012). Embryo Culture. *Humana Press*.
- Thibier, M. (1993). La surveillance sanitaire de l'échange d'embryons bovins sus fécondation *in vitro*. *Rev. Sci. tech. Off. Epiz*, 12 (3):757-772.
- Urego, A., & Restrepo, G. (2006). Implicaciones de la biotecnología reproductiva en la producción animal. 64-78.
- Vajta, G., Lewis, I., Hyttel, P., Thouas, G. A., & Trounson, A. (2001). Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*, 3:89-95.
- Vásquez, H. V. (2016). Influencia de factores socio-economico en la adopción de tecnologías para el mejoramiento genético de ganado vacuno, distrito Florida, Amazonas, Perú, Llima.
- Villa, L., Pacut, C., Slawny, N. A., Ding, J., O'Shea, K. S., & Smit, G. D. (2009). Analysis of the factors that limit the ability of feeder cells to maintain the undifferentiated state of human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 4:641-51.

Yu, X., Jin, G., Yin, X., Cho, S., Jeon, J., Lee, S., & Kong, I. (2008). Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from *in vivo*-produced cat blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 75: 1426-32.

X. ANEXOS

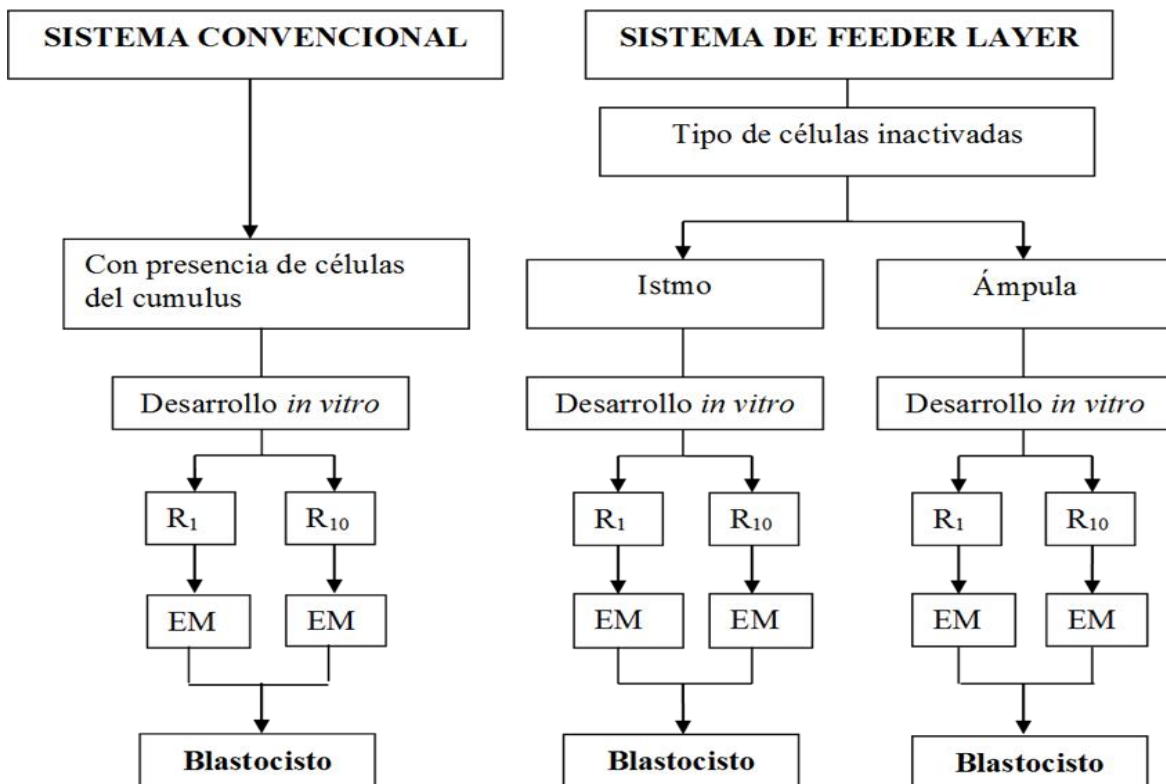
Anexo N° 01 Estado del desarrollo embrionario.



Fuente: Valoración morfológica según IETS (2010).

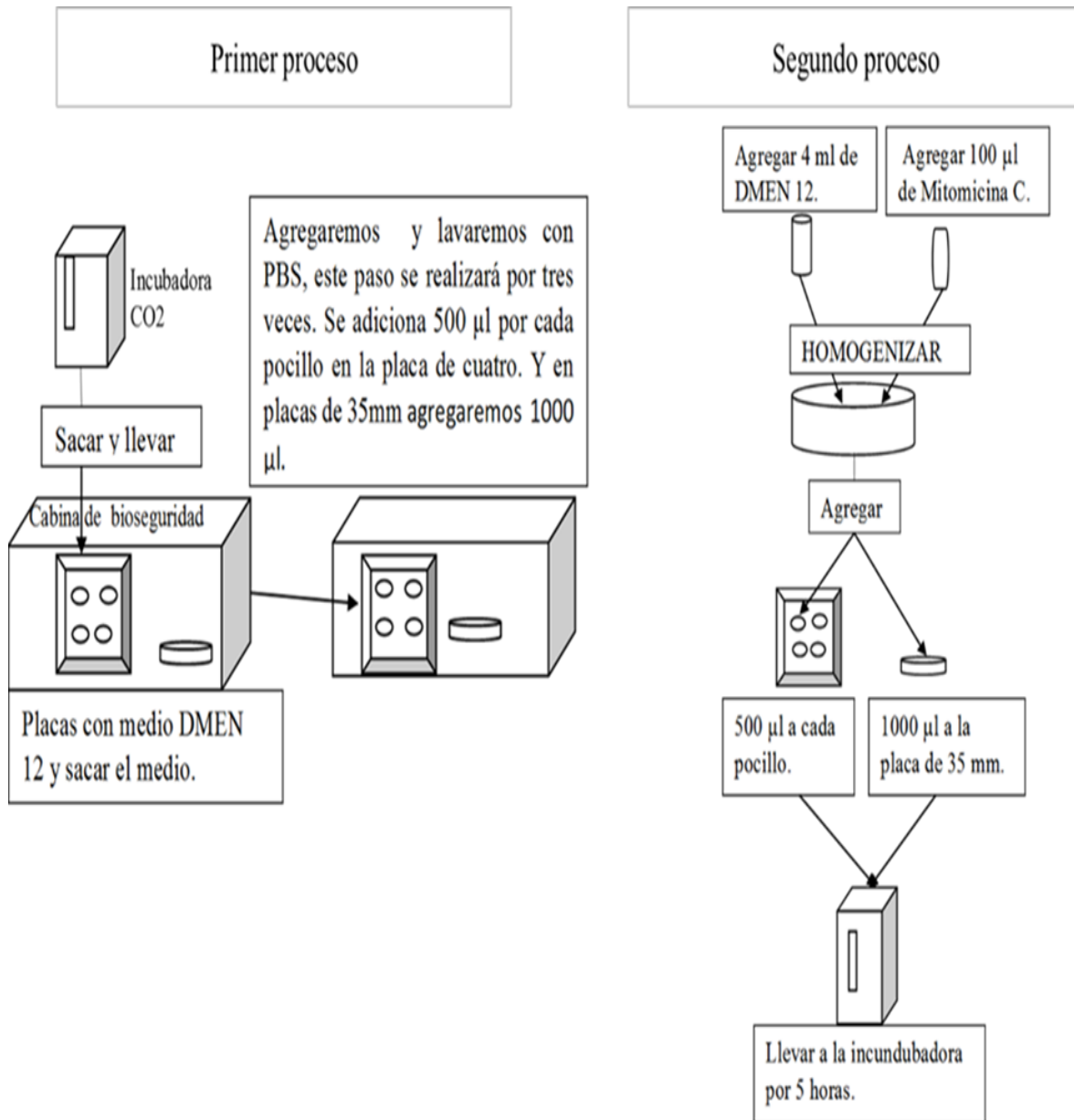
Anexo N° 02 Esquema experimental de la investigación.

Esquematación experimental para el desarrollo de embriones con el sistema feeder layer con células inactivadas del oviducto bovino.



Dónde: T0 = Es el sistema convencional, T0 = Testigo, T1 y T2 = Son las Células alimentadoras inactivadas o sistema feeder layer, T1 = Células del istmo inactivadas con Mitomicina C, T2 = Células del ámpula inactivadas con Mitomicina C, R1... R10 = Son los números de repeticiones de cada tratamiento y EM = Evaluación del porcentaje de cantidad y calidad del embrión en estado de blastocisto.

Anexo N° 03 Procesos de inactivación de las líneas celulares.



Anexo N° 04 Protocolo para la preparación de los medios para la producción *in vitro* de embriones.

A. Medio de transporte de ovarios: Preparación de solución salina al 0.9%.

SOLUCIÓN SALINA 0.9% PARA 1L	
NaCl	9 g
Agua destilada	1 L.
Gentamicina	1 ml

Nota: Después de la preparación de la solución salina llevar a la autoclave y antes de llevar para el transporte de ovarios, adicionar el antibiótico (Gentamicina).

B. Medio de lavado y búsqueda de ovocitos: Preparación del medio de manipulación

MEDIO DE MANIPULACIÓN para 100 ml y 50 ml		
TCM-HEPES	90 ml	45 ml
SFB	10 ml	5 ml
GENTAMICINA	100 ul	50 l

Nota: Después de terminar de hacer el medio siempre se debe filtrar, para luego ser llevado a refrigeración.

C. Medio de Maduración *in vitro*: Preparación del medio de maduración

MEDIO DE MADURACIÓN PARA 10 ml	
TCM-199	9 ml
SFB	1 ml
PIRUVATO	20 ul
FSH-LH	50 ul
GLUTAMINA	60 ul
EGF	10 ul
ETRADIOL	10 ul
GENTAMICINA	10 ul

Nota: Después de culminar de hacer el medio de maduración se debe medir el pH y se debe filtrar, para luego ser llevado a refrigeración.

D. Medio de Fertilización *in vitro*

D.1. Preparación del medio TALP

TALP- (FIV) FERTILIZACIÓN			
	MW	mM	50 ml
NaCl	58.44	114.0	0.3331 gr
KCl	74.55	3.2	0.0119 gr
CaCl ₂ + 2 H ₂ O	147.00	2.0	0.0147 gr
MgCl ₂ + 6 H ₂ O	203.30	0.5	0.0051 gr
NaHCO ₃	84.01	25.0	0.105 gr
NaH ₂ PO ₄	119.98	0.3	0.0018 gr
LACTATO DE Na	112.10	10.0	0.093 ml
ROJO FENOL	354.40	1.0 mg/100 ml	0.0005

D.2. Preparación del medio de fertilización

MEDIO DE FERTILIZACIÓN PARA 10 ml	
TALP-FIV	10 ml
PIRUVATO	100 ul
HEPARINA	100 ul
GENTAMICINA	10 ul
BSA-FAF	0.03 gr

Nota: Después de terminar de hacer el medio de fertilización siempre filtrar.

D.3. Preparación del Percoll al 90 %.

PERCOLL AL 90% PARA 40 ml Y Al 10 ml		
SP-TL 10X	4 ml	1 ml
NaHCO ₃	0.084 gr	0.021 gr
LACTATO DE Na	90 ul	22.5 ul
PERCOLL	36 ml	9 ml
MgCl ₂ 6H ₂ O	158 ul	35.5 ul
CaCl ₂ H ₂ O	78 ul	19.5 ul

D.4. Preparación del SP-TL 10X

SP-TL 10X	
NaCl	4.675 gr
KCL	0.23 gr
NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O	0.40 gr
Hepes	2.38 gr

D.5. Preparación del SP-TL

SP-TL para Percoll para 100ml	
NaCl	0.5785gr
KCl	0.0230gr
NaHCO ₃	0.2104gr
NaH ₂ PO ₄	0.0047gr
Lactato de Na (60%)	0.601ml
HEPESg	0.238gr
CaCl ₂ +2H ₂ O	0.294gr
MgCl ₂ +6H ₂ Og	0.0224gr
Ph	7.4

E. Medio de Cultivo *in vitro*:

E.1. Preparación del medio de cultivo.

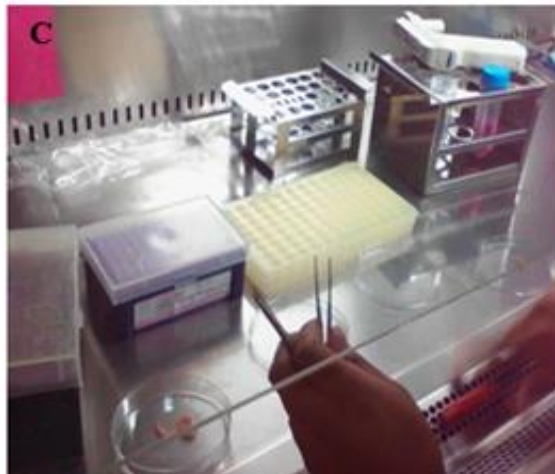
Medio de cultivo	25 ml
SOF base	25ml
Aminoácidos esenciales	20ul
Aminoácidos no esenciales	20ul
Mioinositol	20ul

E.2. Preparación del medio SOF

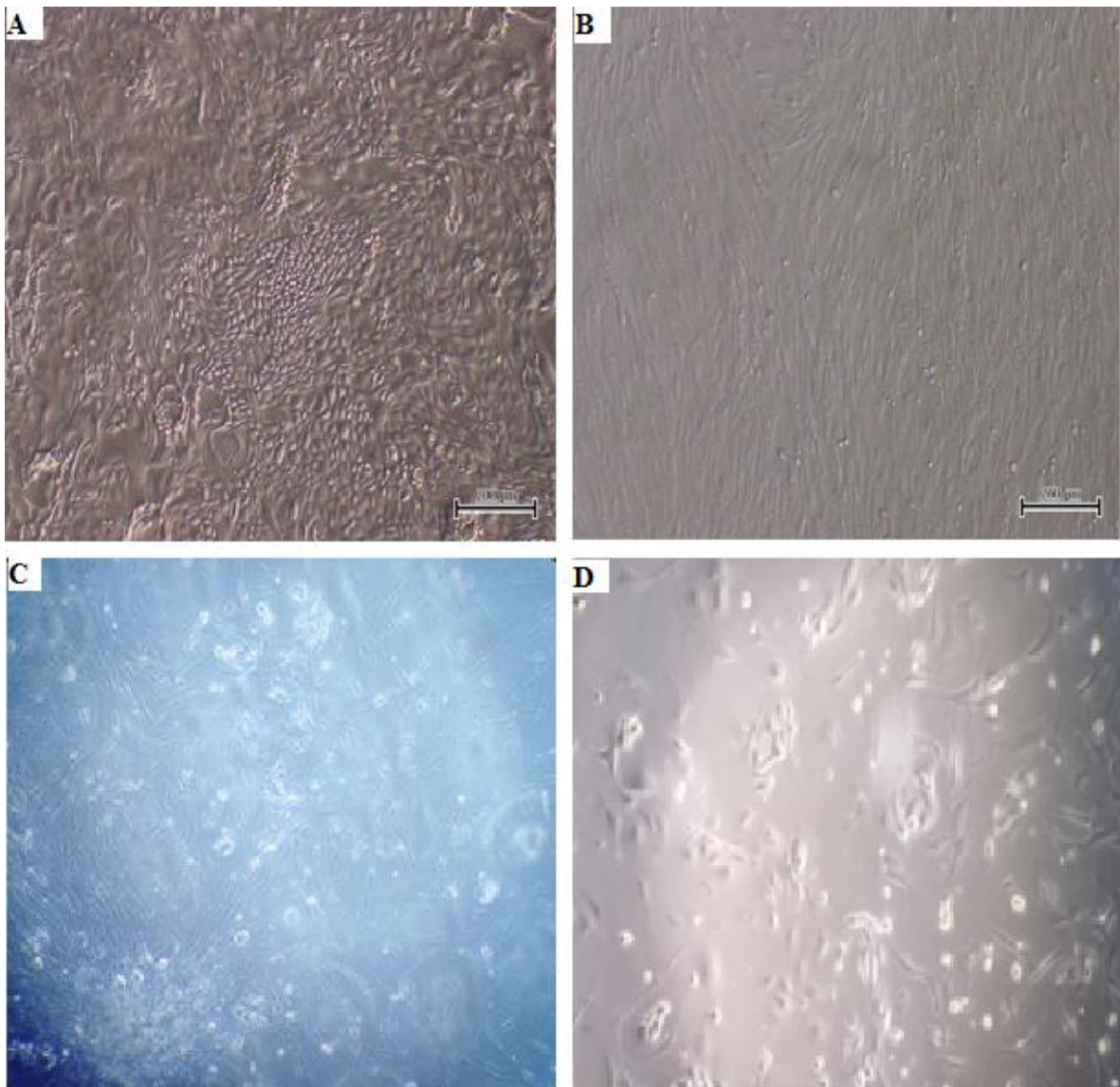
MEDIO SOF			
COMPONENTES	200ml	100ml	50ml
NaCl	1.1688gr	0.5844gr	0.2922gr
KCl	0.1044gr	0.0522gr	0.0261gr
KH ₂ PO ₄	0.0352gr	0.0176gr	0.0088gr
CaCl ₂ +2H ₂ O	0.0496gr	0.0248gr	0.0124gr
MgCl ₂ +6H ₂ O	0.0192	0.0096gr	0.0048gr
NaHCO ₃	0.42gr	0.21gr	0.1050gr
Rojo fenol	0.00028gr	0.00014gr	0.00007gr
Lactato de Na	94.12ul	47.06ul	23.53ul

Nota: Después de terminar de hacer el medio de cultivo siempre se debe de filtrar.

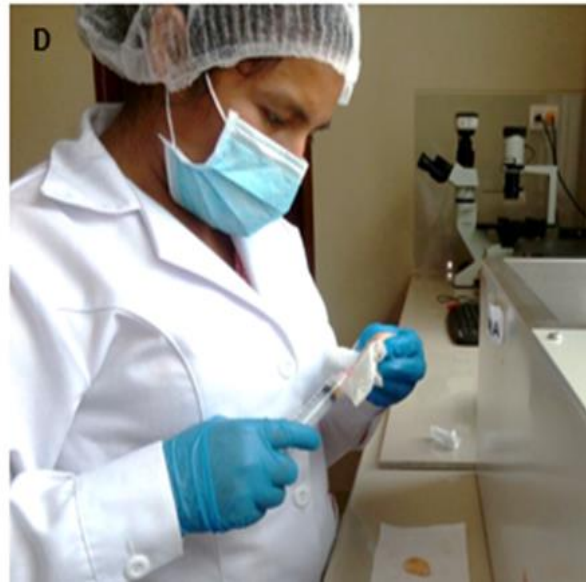
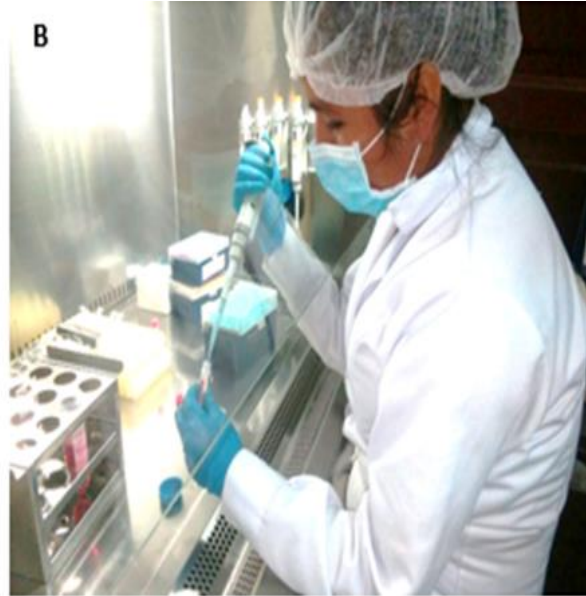
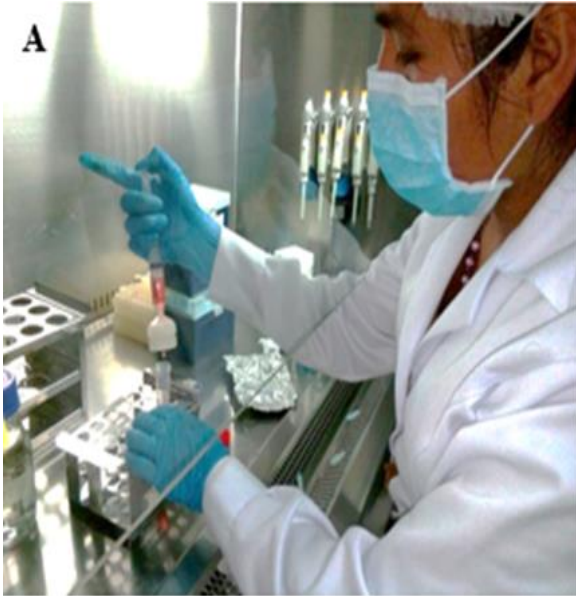
Anexo N° 05 Procesamiento del sistema de Feeder layer



Anexo N° 06 Crecimiento e inactivación de las líneas celulares



Anexo N° 07 Producción *in vitro* de embriones bovinos.



Anexo N° 08 Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.



Anexo N° 09 Co-cultivo *in vitro* de embriones bovinos.

