

**Evaluación de la calidad de embriones bovinos obtenidos *in vitro* mediante aspiración  
folicular de ovarios de planta de beneficio**

**Trabajo de grado para optar por título de Médico Veterinario**

**Simón Sánchez Gómez**

**Asesor  
Jhonny Alberto Buitrago Mejía  
Médico Veterinario y Zootecnista**

**Unilasallista Corporación Universitaria  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Programa de Medicina Veterinaria  
Caldas-Antioquia  
2023**

## Tabla de contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>8</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>9</b>
Objetivo general:.....	9
Objetivos específicos: .....	9
<b>Justificación.....</b>	<b>10</b>
<b>Marco Teórico .....</b>	<b>11</b>
Producción <i>in vitro</i> de embriones.....	11
Historia de la producción <i>in vitro</i> de embriones.....	11
La PIVE en la actualidad .....	12
Importancia de la PIVE.....	12
Limitaciones de la PIVE .....	14
Técnicas que componen la PIVE .....	14
Colecta de ovocitos:.....	14
Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos:.....	15
Fertilización <i>in vitro</i> : .....	16
Cultivo de embrionario: .....	17
Evaluación del clivaje: .....	18
Evaluación de blastocistos: .....	19
Crio preservación: .....	19
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>20</b>
Población y muestra .....	20

<b>Preparación de medio de Maduración <i>in vitro</i> (MIV):</b> .....	<b>20</b>
<b>Procesamiento de ovarios y maduración de ovocitos <i>in vitro</i> (MIV):</b> .....	<b>20</b>
<b>Evaluación de Maduración de ovocitos:</b> .....	<b>21</b>
<b>Fertilización <i>in vitro</i>:</b> .....	<b>22</b>
<b>Proceso de paso del medio FIV al medio CIV:</b> .....	<b>23</b>
<b>Proceso de evaluación de clivaje:</b> .....	<b>23</b>
<b>Proceso de evaluación de Blastocistos:</b> .....	<b>23</b>
<b><i>Resultados</i></b> .....	<b>24</b>
<b>Cantidad y calidad de los ovocitos</b> .....	<b>24</b>
Extracción de ovocitos por aspiración folicular: .....	24
Proceso de maduración <i>in vitro</i> : .....	24
Proceso de evaluación del clivaje: .....	25
Evaluación de blastocistos día siete post fertilización: .....	26
<b><i>Discusión:</i></b> .....	<b>27</b>
<b><i>Conclusiones:</i></b> .....	<b>29</b>
<b><i>Bibliografía</i></b> .....	<b>30</b>

**Lista de Tablas**

Tabla 1. Cantidad de ovarios obtenidos y ovocitos viables recuperados en cada aspiracion post mortem. ....	24
Tabla 2 tasa de maduración de ovocitos .....	25
Tabla 3 Tasa del clivaje. ....	25
Tabla 4 tasa de obtención de blastocistos.....	26

**Lista de Ilustraciones**

Ilustración 1. esquema de clasificación de oocitos (Betancur, 2008). .....	21
--	----

## Resumen

La biotecnología de la reproducción animal avanza cada vez más gracias a los beneficios que ofrece en cuanto a los aspectos económicos y de calidad. Un conjunto de pasos bien definidos caracterizan la producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos, que permite mejorar a los individuos de hatos ganaderos fenotípicamente en poco tiempo, obtiene productos de mejor calidad en el mercado, ayudando así al sector ganadero.

Los objetivos de este trabajo comprenden la aplicación de las biotecnologías reproductivas que se utilizan para la producción de embriones bovinos y la evaluación de los mismos al llegar al estadio de blastocisto al día siete post fertilización *in vitro*. Durante la práctica se aprendió sobre manejo de utensilios en el laboratorio, bioseguridad, biotecnologías reproductivas en el bovino, manejo de estructuras biológicas en campo y en laboratorio, protocolos de extracción de ovocitos, proceso de maduración de ovocitos *in vitro*, evaluación objetiva y subjetiva de la maduración del ovocito, proceso de fertilización de ovocitos *in vitro*, capacitación seminal y fertilización con semen descongelado, desnudación del posible cigoto y cambio de medios para el cultivo embrionario, evaluación del clivaje de los nuevos cigotos, etapas del cultivo embrionario, evaluación de los embriones y clasificación de los blastocistos. Técnicas manejadas en el laboratorio de biotecnología animal, línea de embriología del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid (PCJIC).

La metodología empleada fue basada en clases teóricas sobre producción *in vitro* de embriones para comprender a fondo lo que sucede en el laboratorio, cómo y por qué se realizan los protocolos para lograr producir un embrión de calidad que sea transferible o congelable para su posterior transferencia. La otra parte de la metodología empleada durante la práctica fue realizada en el laboratorio, donde se simula *in vitro* todo lo que pasaría *in vivo*, pero con la posibilidad de trabajar con altos volúmenes de ovocitos que pueden llegar a ser fecundados y así lograr una mayor cantidad de individuos, que no sólo son más, sino también

de mejor calidad ya que los ovocitos y los espermatozoides pueden ser seleccionados para dar individuos con mérito genético superior.

En la práctica se hace uso de ovocitos provenientes de planta de beneficio por fines académicos y de investigación, al igual que el uso de semen proveniente de toros colectados por el laboratorio de Andrología del PCJIC.

Los resultados obtenidos durante la práctica fueron altamente concordantes con los resultados que se logran en los laboratorios estandar con valores reflejados en los porcentajes obtenidos. Se espera que cada vez, se puedan mejorar los porcentajes de embriones obtenidos viables. Los blastocistos obtenidos son de la calidad esperada, es decir, calidad suficiente para ser transferidos o congelados para suposterior uso dentro de las aplicaciones reproductivas de la PIVE.

**Palabras clave:** biotecnología reproductiva, producción de embriones, bovinos, fertilización *in vitro*, mejoramiento genético.

## Introducción

La Producción *in vitro* de embriones (PIVE) surgió gracias a la necesidad de mejorar el desempeño reproductivo de diferentes especies, y ha presentado un auge en las últimas décadas debido a las herramientas con las que ahora se cuenta para aumentar la eficiencia productiva, y su aplicación en las áreas de la producción animal y la investigación, en la era de la transgénesis y la clonación de animales (Fernández, Diaz, & Muñoz, 2007).

La producción de embriones bovinos permite generar animales con características fenotípicas deseadas a partir de progenitores seleccionados y cuidando ciertas variables que no se pueden controlar cuando se utilizan medios convencionales como la inseminación artificial o la monta natural, además de que se puede potenciar el aprovechamiento y el potencial reproductivo de hembras de alto valor, obteniendo más embriones de los que se podría por los métodos tradicionales (García Recillas & Martí, 2013).

Dentro de las limitantes de la PIVE se encuentra la necesidad de recursos, pues la esta técnica requiere de instrumentaria, laboratorio dotado y unas condiciones que sirvan para recrear el ambiente folicular y oviductal de la hembra, además de ello la calidad de los embriones producidos *in vitro* son de menor calidad respecto a aquellos obtenidos *in vivo*, y su rendimiento hasta la etapa de blastocisto es menor, teniendo una mayor mortalidad embrionaria post transferencia (Peláez Peláez, 2011). También es preciso decir que existen características fenotípicas indeseadas como gigantismo en el caso de los bovinos, que se asocian con distocias por exceso de volumen fetal en embriones provenientes de laboratorio (Peláez Peláez, 2011).

Debido a la escasa información reportada en el país acerca de la PIVE este trabajo busca evaluar la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro* en el laboratorio de embriología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid.



## Objetivos

### Objetivo general:

Evaluar calidad de embriones bovinos producidos *in vitro* en el laboratorio de embriología animal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid.

### Objetivos específicos:

- Determinar la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos mediante la técnica de aspiración folicular en ovarios de hembras bovinas destinadas a beneficio.
- Evaluar la eficiencia del proceso de fertilización *in vitro* de ovocitos obtenidos mediante la técnica de aspiración folicular de ovarios de hembras bovinas destinadas a beneficio.
- Evaluar la tasa de viabilidad de los embriones después de los procesos de cultivo y clivaje, adquiridos a partir de ovocitos obtenidos mediante la técnica de aspiración folicular de ovarios de hembras bovinas destinadas a beneficio.

## Justificación

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) se convierte en un conjunto de herramientas que facilitan mejorar la reproducción en los bovinos gracias a que es posible aprovechar al máximo las capacidades reproductivas de hembras y machos. Una hembra puede donar ovocitos o ser aspirada por OPU cada 15 días (Puerta Gómez, 2006) para hacer fertilizaciones *in vitro* con semen que, a su vez, convierte el proceso más económico debido a que el volumen necesario para la fertilización *in vitro* es mucho menor que para inseminación *in vivo* y, por ende, es menos costoso producir embriones *in vitro* a gran escala. También hay protocolos hormonales para los lavados embrionarios que no son necesarios durante la fertilización *in vitro* (Puerta Gómez, 2006).

La demanda de la PIVE es cada vez mayor, incrementando de manera progresiva desde el año 2016. En 2021 se registró un record de 1.200.000 embriones producidos *in vitro*, que sobrepasa a los 362.728 embriones producidos *in vivo* a nivel mundial según el informe anual de la IETS (International Embryo Technology Society) (IETS, 2023).

Los embriones producidos *in vitro* permiten que los pequeños productores puedan tener acceso a unos animales de mejor genética, esto gracias a que solo van a necesitar tener una vaca receptora sincronizada y lista para gestar el embrión que se transferirá. Los embriones que se producen en los laboratorios pueden tener genéticas diseñadas que permitan formar individuos de fenotipos esperados y esto ayuda a mejorar los hatos ganaderos de los que necesitan tener una mejor productividad en sus ganaderías (García Recillas & Martí, 2013). Esto quiere decir que es mucho más económico obtener, por medio de esta biotecnología reproductiva, animales de mérito genético superior, que comprar los mismos ya nacidos.

## Marco Teórico

### Producción *in vitro* de embriones

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es un proceso mediante el cual se pueden lograr mejoras genéticas en hatos ganaderos en solo una generación mediante diferentes procesos que facilitan este fin. La PIVE comprende la extracción u obtención de ovocitos ya sea por aspiración folicular, por laparoscopia, OPU (ovium pick up) o aspiración folicular de ovarios de planta de beneficio, los cuales son seleccionados para ingresarlos al proceso de maduración *in vitro* donde se espera que lleguen al estadio ideal para ser fecundados por espermatozoides previamente capacitados, este último evento se denomina fertilización *in vitro*, que comprende la co-incubación de los ovocitos maduros y el espermatozoides capacitados. Finalmente, los posibles cigotos se cultivan hasta llegar al estadio de blastocisto y quedar listos para ser transferidos o congelados (Ángela María Gonella Díaz<sup>1</sup>, 2013).

### Historia de la producción *in vitro* de embriones

El primer cultivo embrionario de un mamífero fue realizado en 1912 por Brachet (Urrego Álvarez & Restrepo, 2006), seguido a esto Whitten en 1957 utilizó la adición de lactato como fuente de energía para el medio de cultivo embrionario ya formado por bicarbonato de sodio y albúmina, lo que mejoró notablemente la tasa de obtención de blastocistos de ratón (Urrego Álvarez & Restrepo, 2006), esto abrió nuevas posibilidades que permitieron posteriormente llevar a cabo la PIVE. En 1930 Pincus et al realizaron el primer reporte de FIV exitosa, la cual se hizo con células de conejo (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008), y en 1977 Iritani y Niwa realizan el primer reporte de FIV en ovocitos bovinos madurados *in vitro* en Japón, convirtiendo la PIVE en la biotecnología investigativa con mayor impacto sobre la ganadería desde que se empezó a implementar la inseminación artificial IA (Restrepo Betancur

& Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008).

### **La PIVE en la actualidad**

En la producción bovina a nivel mundial hay una gran demanda por la PIVE. Una cantidad diversa de motivos fomentan dicha demanda y conllevan al sector investigativo a mejorar cada vez más sus técnicas y convertirse en eficientes productores de embriones bovinos para satisfacer al mercado. Principalmente, la PIVE en la especie bovina se enfoca en la producción de animales de mérito genético o que expresen características de interés y que sean desarrollados en pocas generaciones, lo que permite hacer muy eficiente la mejora genética de animales de grandes y pequeños productores del sector ganadero. La variabilidad genética de animales de producción es muy importante para tener y mantener una base de información genética que permita formar individuos libres de degeneraciones intra específicas y con características productivas importantes de mejora constante. Con la PIVE se permite tener un mayor control sobre la variabilidad genética y, por ende, es una gran herramienta para avanzar en la industria (FAO, 2023).

### **Importancia de la PIVE**

Dentro de las biotecnologías reproductivas la PIVE es reconocida en cuanto a que permite lograr individuos de fenotipos deseados en una sola generación (Gonella Diaza, Atuesta, Bernal Ulloa, & Chacón Jaramillo, 2013). Se estima que las hembras bovinas al nacimiento tienen alrededor de 75.000 ovocitos y lo normal es que se logren obtener entre cuatro y cinco crías en su vida adulta o tiempo de producción, por lo que se estaría subutilizando a las hembras bovinas con alto valor genético si se usa inseminación artificial o monta natural (Gonella Diaza, Atuesta, Bernal Ulloa, & Chacón Jaramillo, 2013). Es importante entender que los embriones obtenidos a partir de PIVE son seleccionados bajo diferentes

estándares de calidad, permitiendo seleccionar el mejor ovocito que será fecundado, la calidad del semen que será utilizado para el proceso de fertilización o de co-incubación entre espermatozoides y ovocitos, la raza y el mérito genético de los progenitores del embrión que se produce, los medios de maduración, fertilización, cultivo y crío preservación. Esta última nos permite conservar al embrión por tiempo indefinido hasta tener una hembra de elección receptora y bien sincronizada. Al asociar las técnicas de PIVE y la producción de bovinos para la industria ganadera, se obtiene un producto cada vez más deseado dentro del mercado (Ferré, y otros, 2019).

Las posibilidades de que los pequeños productores mejoren sus hatos son significativas, lo que permite mejorar sus porcentajes productivos en la línea seleccionada, ya sea cárnica, láctea o doble propósito. Si los hatos ganaderos son productivamente mejores, los productores tendrán mayores ganancias, con menores inversiones posteriores a la mejora de su ganado. Esto dispara la economía del sector, que en la actualidad colombiana generaría progreso efectivo puesto que existe una gran cantidad de pequeños productores que se verían beneficiados (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008).

En general en el mundo y en Colombia la PIVE ha aumentado considerablemente, principalmente en empresas privadas por los beneficios que conlleva, sin embargo, se ha establecido que aún hay necesidad de investigación y mejora de las técnicas de PIVE.

Existen animales que pueden nacer con características asociadas a la PIVE que son negativas y pueden afectar la meta de esta biotecnología reproductiva (Camargo, y otros, 2018), (Colazo & Mapletoff, 2007).

Si es posible tener una buena estandarización de la PIVE, con buenos protocolos de trabajo y con tasas eficientes de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, fertilización *in vitro*, cultivo *in vitro* de embriones, crío preservación y transferencia de embriones, es factible avanzar en más campos de investigación que nos permitan conocer más sobre la biología

reproductiva del bovino, técnicas de mejoramiento animal bajo parámetros moleculares, edición génica para formar individuos con mejores características físicas y de producción, editar embriones como modelos biológicos, lograr disminuir enfermedades o estudiar las mismas cuando sean de naturaleza hereditaria, avanzar en técnicas de micro manipulación como ICSI y clonación, cultivo de células madre y estudiar la diferenciación celular, transgénesis y conservación de especies con similar fisiología, anatomía o fisiología reproductiva que se encuentren en extinción o degeneración de la especie por falta de variabilidad genética (Fernández, Diaz, & Muñoz, 2007).

### **Limitaciones de la PIVE**

El uso de la PIVE presenta algunas limitantes dentro de las que se destacan fenotipos indeseados (Guerra, Sandoya, & de Armas, 2012; Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008), el cultivo *in vitro* (CIV) de los embriones, que por la suplementación que debe llevar el medio con suero fetal bovino (SFB) se genera una mayor acumulación de lípidos en el embrión y se convierte en el responsable de las afecciones que impiden o entorpecen el proceso de cultivo embrionario en la incubadora y de crío preservación posterior (Restrepo Betancur, Gutiérrez, & Araque, Efecto de la suplementación con suero fetal bovino para la maduración *in vitro* de oocitos bovinos sobre su actividad mitocondrial y desarrollo e, 2007; Youngs, Leibo, & Godke, 2010).

### **Técnicas que componen la PIVE**

#### ***Colecta de ovocitos:***

Para la colecta de ovocitos se utilizan diferentes métodos entre los cuales se destacan la OPU y la aspiración folicular de ovarios *post mortem*. la técnica OPU (ovium pick up) consiste en la aspiración folicular *in vivo*, en el que se tiene a un aspirador capacitado para

realizar el procedimiento. La OPU puede realizarse en campo con la instrumentaria adecuada que consta básicamente de una guía de aspiración, una bomba de aspiración y un equipo de ultrasonografía. El aspirador debe palpar al bovino vía rectal para fijar con su mano el ovario y vía vaginal se introduce la guía de aspiración que está sosteniendo el transductor del ecógrafo y la aguja acoplada a la bomba de aspiración, de modo que por la pantalla del ecógrafo se puedan observar los folículos y poderlos aspirar por medio de la bomba (Ruiz, 2010).

La otra técnica se refiere a una aspiración manual de los folículos observables en los ovarios de bovinos *post mortem* con aguja y jeringa (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008).

#### ***Maduración in vitro de ovocitos:***

La maduración de un ovocito es el proceso mediante el cual este desarrolla su capacidad para ser fecundado. Por métodos *in vitro* este proceso tiene una duración de 22 a 24 horas (Ferré, y otros, 2019). La maduración de un ovocito en el laboratorio puede medirse de formas subjetivas y objetivas. La evaluación subjetiva consiste en la observación de la expansión de las células del cumulus. Estas células están compactas alrededor de los ovocitos y se expanden al madurar, cuando estas se expanden, le permiten la entrada al espermatozoide y producen la reacción acrosomal, que es la reacción en el acrosoma del espermatozoide la cual le permite a éste liberar su material genético dentro del ovocito durante la fecundación. (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008), (Ferré, y otros, 2019).

La valoración objetiva de la maduración se realiza solamente con fines investigativos a nivel de laboratorio para saber que los ovocitos están realmente maduros, ya que este método

consiste en observar la explosión del primer corpúsculo polar. Los ovocitos deben pasar por un proceso de división del material genético para convertirse en células haploides. Dicho proceso se denomina meiosis, que a su vez se divide en meiosis I y meiosis II. Cuando el ovocito pasa por la meiosis I, éste debe expulsar la mitad de su material genético para poder ser fecundado y obtener la otra mitad del material genético del espermatozoide. Cuando el ovocito termina meiosis I, se puede observar que se expulsa un pequeño cuerpo esférico que contiene material genético ubicado en el espacio perivitelino, por lo que su visualización es un indicativo de que el ovocito ha culminado meiosis I y está listo para recibir al espermatozoide (Ferré, y otros, 2019).

### ***Fertilización in vitro:***

Para este proceso se co-incuban los espermatozoides y los ovocitos para finalmente dar inicio a la formación de un nuevo individuo. Inicialmente se debe descongelar el semen de una pajilla o tomar semen fresco luego de la colecta del toro de elección, este semen debe capacitarse *in vitro*, simulando lo que sucede en el aparato reproductivo de la hembra. El semen de los toros debe pasar por diferentes pasos para lograr hacer una fecundación efectiva, estos pasos comprenden:

1. La activación: cuando salen de líquido seminal.
2. La capacitación: que se da en oviducto, donde los espermatozoides abren sus canales de calcio y disminuyen su pH intracitoplasmático.
3. Hiperactivación: que les permite pasar entre cilias y curvas oviductales.
4. Reconocimiento entre gametos: cuando se encuentra con el ovocito.
5. Reacción acrosomal: por medio de las células del cumulus el acrosoma se cae y permite la entrada del material genético al ovocito.
6. Adhesión y fusión.



(Ferré, y otros, 2019).

Para recrear estos pasos *In vitro* lo que se realiza es una selección de los espermatozoides en un medio con capacitantes espermáticos. Los capacitantes comunmente utilizados son PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina), piruvato de sodio, heparina, incluso cafeína. También se hace una selección de los mejores espermatozoides, se realiza de varias formas entre las que destacan el swim up: donde se centrifuga el semen por doce minutos a 235G, se retira el sobrenadante conservando el pellet formado, se adiciona 1ml de medio de cultivo, se incuba por 60 minutos a 37°C colocando el tubo con inclinación de 45°. Finalmente, los espermatozoides de mejor calidad nadan hacia arriba por geotropismo negativo (función inherente al espermatozoide).

El otro método es el gradiente, donde los espermatozoides móviles son separados mediante el uso de gradientes de diferentes densidades (45% y 90%) diluidos en una solución isotónica, se centrifugan a 700G por 20 minutos y luego el segundo centrifugado a 500G por 5 minutos (protocolo del laboratorio biotecnología animal PCJIC).

Una vez el semen está preparado para la fecundación, se pone en co-incubación con los ovocitos maduros en condiciones similares al oviducto: 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 90% de N a 38°C (Restrepo Betancur & Grupo de Investigacion en Biotecnologia Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en colombia, 2008).

### ***Cultivo de embrionario:***

*In vivo* las células del cumulus son retiradas por la cilia oviductales a medida que el cigoto avanza por el oviducto hacia el útero, la fecundación se da en la unión istmo-ampular del oviducto y de ahí al día siete el blastocisto llega al útero. luego de la fecundación la primera división celular se da a las 24 horas, formando dos células que se denominan blastómeras, la segunda división celular se da a las siguientes 24 horas, siendo blastómeras pero en estadio

de cuatro células, de este punto en adelante, las divisiones celulares se dan cada 12 horas y se denominan estadio de ocho células, 16 células, 32 células, mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido y blastocisto eclosionado. Siendo los dos últimos, los que pasa al día siete del oviducto al útero.

*In vitro* al siguiente día de la FIV se desnudan los posibles cigotos con pipeta bucal simulando el proceso natural y se cultivan en medio fluido oviductal sintético (SOF) hasta el día siete (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008), (Ferré, y otros, 2019).

### ***Evaluación del clivaje:***

Desde la FIV, al día cuatro se evalúa el clivaje, el cual es la división celular que se da luego de la fecundación. Entre los estadios del cigoto de cuatro y ocho células se da la activación del genoma embrionario, dicha activación es cuando ya está listo el cigoto para producir, a partir de su nuevo genoma, sus propias proteínas y seguir su formación por sí sólo, antes de esta activación el cigoto logra desarrollarse gracias a las reservas ovocitarias que le brinda la madre en el ovocito mientras su genoma está listo para activarse y continuar su formación como individuo (Eduviges Burrola-Barrazaa & González-Ro, 2012). el clivaje se evalúa en el laboratorio por dos razones primordiales, la primera es identificar los cigotos que sí clivaron, o que sí son realmente cigotos y están avanzando en su formación. La segunda es separar los cigotos que han clivado de los muertos y degenerados ya que los embriones se comunican y se co-ayudan entre sí, por lo que dejarlos juntos puede dañar proceso de formación de los clivados (protocolos del laboratorio de biotecnología animal PCJIC).

***Evaluación de blastocistos:***

Los blastocistos de deben evaluar y clasificar a nivel de laboratorio para saber cuáles son aptos para transferir o criopreservar. Los estadios más resistentes a la criopreservación son los blastocistos expandidos y las mórulas compactas. Si se trata de transferencia directa, se puede hacer desde mórula hasta blastocisto expandido. Los blastocistos eclosionados son, en teoría, los de mejor calidad, pero no son resistentes a las criopreservación (Díaz Pazmiño & Hurtado, 2010).

***Crio preservación:***

La crio preservación puede realizarse mediante dos técnicas, la congelación lenta y vitrificación (Luis B. Ferré, 2020), (Celestinos & Gatica, 2002); la congelación lenta es una técnica que utiliza una curva de congelación de 0.5°C/min hasta poner el embrión en -34°C lo que permite congelar al embrión, pero genera daños criogénicos. Por otro lado, la congelación ultra rápida o vitrificación, ayuda a disminuir la formación de cristales de hielo y la curva de enfriamiento es de 2.500°C/min. En ambas situaciones se deben usar medios o soluciones de crío preservación donde se deshidrata al embrión antes del proceso de congelación, lo que impedirá la formación de una gran cantidad de cristales de hielo que afecten luego la viabilidad de las estructuras (Segura-Correa & Montes-Pérez, 2001) (Seneda, 2013). Asimismo, es importante el uso de diferentes soluciones de críoprotección que ayuden con la protección de la membrana y de las estructuras embrionarias internas (Youngs, Leibo, & Godke, 2010; Puerta Gómez, 2006). La críopreservación debe ir de la mano con la PIVE ya que ésta permitira aumentar la eficiencia, puesto que permite mantener las estructuras en un periodo de inactividad por tiempo indefinido.

## **Materiales y Métodos**

### **Población y muestra**

Para este estudio se utilizaron ovarios obtenidos de bovinos beneficiados en la central ganadera del municipio de Medellín. los ovarios fueron obtenidos de los procesos de beneficio realizados los días lunes. Se incluyeron ovarios de bovinos de diferentes razas y edades.

los ovarios fueron seleccionados evitando usar aquellos que presentaran demasiados folículos dominantes y los que presentaran signos de infección.

Se realizaron once colectas, de donde se obtuvieron alrededor de 50 ovarios en cada una para facilitar la selección de ovocitos en el laboratorio, los ovarios seleccionados fueron almacenados en una bolsa ziplock y refrigerados para su transporte al laboratorio (protocolo laboratorio biotecnología animal PCJIC).

### **Preparación de medio de Maduración *in vitro* (MIV):**

Todo este proceso se realiza en una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones. En una placa de Petri se ponen gotas del medio de maduración según la cantidad de ovocitos que se espera obtener, usando una relación de 10 a 15 ovocitos por cada gota de 100ul de medio MIV, posteriormente se cubren las gotas con aceite de uso de laboratorio y se dejan la placa en la incubadora calibrando un día antes al procesamiento de los ovarios.

### **Procesamiento de ovarios y maduración de ovocitos *in vitro* (MIV):**

Una vez en el laboratorio se realiza la aspiración folicular a temperatura ambiente y en condiciones estériles. Se realiza una punción sobre la superficie lateral al folículo buscando obtener de cada folículo la mayor cantidad posible de líquido folicular. Una vez la jeringa se llenaba su contenido se homogeniza y se trasfiere a un tubo falcon, el cual se deja sedimentar

por mínimo 5 minutos. posteriormente se extrae el sedimento del líquido del tubo y se vierte en cajas Petri que contengan un medio de suspensión celular como PBS o TAPLH, donde se realiza la búsqueda de los ovocitos bajo estereomicroscopio.

Al finalizar la búsqueda se realiza una clasificación de los ovocitos, según los criterios descritos por Betancur (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008). (ver figura 1).

Tipo	No. Células cúmulus	Citoplasma
1 =Excelente	Capas múltiples, compactas de células (cuatro o más)	Homogéneo y transparente
2 =Bueno	Capas múltiples de células de cúmulus (entre una y tres)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
3 =Regular	Denudados	Irregular con zonas oscuras
4 =Malo	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

**Ilustración 1. esquema de clasificación de ovocitos (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008).**

Se consideran ovocitos viables solo aquellos de grados uno y dos, los que presentan grados tres y cuatro se consideran no viables y son descartados.

Posteriormente se ingresan a las gotas de medio MIV y se realiza su incubación en ambiente controlado con 90% de nitrógeno, 5% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub> por 22 a 24 horas.

#### **Evaluación de Maduración de ovocitos:**

Se introducen los ovocitos en un recipiente con tripsina diluida 1:1 con medio de suspensión celular, se realizan 50 pipeteos y se pasan al vórtex por dos minutos. Al finalizar el

vórtex, el contenido se pone en una caja de Petri pequeña para evaluar la extrusión del primer cuerpo polar de los ovocitos bajo estéreo microscopio.

Los ovocitos seleccionados serán aquellos que presenten un citoplasma oscuro y homogéneo, con la hendidura característica del sitio en el que se extruye el cuerpo polar, que el cuerpo polar no sea exactamente del mismo color y textura del citoplasma (ya que se puede confundir con una fragmentación de este), que el corpúsculo se encuentre en el espacio perivitelino, zona pelúcida intacta y sin discontinuidades.

### **Fertilización *in vitro*:**

el semen se deposita dentro de un tubo eppendorf que contiene medio de capacitación espermática y medio de fertilización *in vitro*, este se centrifugo por cinco minutos a 450G, posteriormente se elimino el sobrenadante, dejando el pellet (sedimento) con más o menos 100ul.

Se evaluó la concentración seminal en cámara de Neubauer y se evalúa la motilidad inicial de los espermatozoides. Para continuar con el proceso se calcula la cantidad del pellet que necesitamos para la cantidad de medio que deseamos usar en el proceso de fertilización *in vitro*, de acuerdo con la cantidad de ovocitos que se desean fecundar.

Una vez se adiciona la cantidad de pellet del semen en el medio FIV, se evalúa la motilidad final, se preparan las gotas de FIV y los espermatozoides en una caja de Petri y se cubren con aceite. Los ovocitos que estaban en proceso de maduración se pasaban a las gotas FIV y Finalmente se ingresaban a la incubadora por 18 a 20 horas (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008).

**Proceso de paso del medio FIV al medio CIV:**

los cigotos que se encontraban en FIV se desnudaron de forma manual con pipeta bucal en el estereomicroscopio. Una vez finalizada la denudación se ingresan en medio SOF (fluido oviductal sintético) o CIV (cultivo *in vitro*) previamente calibrado en la incubadora por al menos 45 minutos.

**Proceso de evaluación de clivaje:**

Se sacan los posibles cigotos de la incubadora y bajo estereomicroscopio se pasan de gota los que se vean clivados. al día tres posts FIV, considerando la visualización de estructuras compatibles con embriones en el estadio de 8 a 16 células, citoplasmas homogéneos, definidos, oscuros y con divisiones celulares simétricas. Al finalizar el proceso de clasificación se procede ingresar las estructuras seleccionadas a la incubadora hasta el día siete.

**Proceso de evaluación de Blastocistos:**

Al día siete bajo el estereomicroscopio se evalúan los embriones que están en el medio CIV en la incubadora y se evalúa el porcentaje de blastocistos obtenidos y se clasifican en las siguientes categorías: BI (blastocisto inicial = 30% de blastocele, poca división del macizo celular interno (MCI) y trofoblasto, zona pelúcida gruesa), BL (blastocisto: 50% de blastocele, mayor división en trofoblasto y MCI, zona pelúcida gruesa), Bx (blastocisto expandido = 70% de blastocele, MCI y trofoblasto se pueden diferenciar fácilmente, zona pelúcida delgada) y Be (blastocisto eclosionado = MCI y trofoblasto se ven perfectamente, blastocele bien formado, zona pelúcida discontinua por la eclosión).

## Resultados

### Cantidad y calidad de los ovocitos

#### *Extracción de ovocitos por aspiración folicular:*

Durante el periodo experimental se recuperaron en cada repetición un promedio de 50 ovarios, recuperando un promedio de 132 ovocitos por experimento y un promedio de 3 ovocitos viables por ovario (tabla 1)

Repetición	Cantidad de ovarios	Oocitos viables	Oocitos viables/ovario
1	35	150	4,3
2	34	69	2,0
3	62	120	1,9
4	80	159	2,0
5	62	225	3,6
6	42	67	1,6
7	56	150	2,7
8	52	115	2,2
9	18	40	2,2
10	52	165	3,2
11	60	190	3,2
<b>PROMEDIO</b>	50	132	3

*Tabla 1. Cantidad de ovarios obtenidos y ovocitos viables recuperados en cada aspiración post mortem.*

#### *Proceso de maduración in vitro:*

En el proceso de maduración se obtuvo una tasa de maduración del 69,2% (227/157), oscilando entre el 25 y el 84%. La maduración no se observó en todas las repeticiones ya que, para el proceso, los ovocitos evaluados no pueden usarse para fertilización (tabla 2).



Repetición	No. Ovocitos evaluados en total	No. De ovocitos maduros	% de maduración
3	8	2	25
4	25	17	68
5	73	48	65,8
7	30	22	73,3
9	13	11	84,6
10	44	32	72,7
11	34	25	73,5
<b>TOTAL</b>	227	157	69,2

*Tabla 2 tasa de maduración de ovocitos .*

**Proceso de evaluación del clivaje:**

El clivaje de los posibles cigotos, por facilidad de las instalaciones del laboratorio, se evalúa al día tres post-fertilización, encontrando a los ovocitos en estadíos de 8 y 16 células. Para el caso encontramos una tasa de clivaje general del 44,87%, respecto al número de ovocitos ingresados al proceso de maduración y dejando de lado a las estructuras que se encuentren degeneradas o en proceso de apoptosis.

	No. Ovocitos evaluados	No. Ovocitos clivados	% clivaje
repetición 1	107	46	42,99
repetición 2	61	26	42,62
repetición 3	61	17	27,87
repetición 4	47	20	42,55
repetición 5	132	94	71,21
repetición 8	97	37	38,14
repetición 10	99	31	31,31
total	604	271	44,87

*Tabla 3 Tasa del clivaje.*

**Evaluación de blastocistos día siete post fertilización:**

De los 385 embriones evaluados solo el 22.08% llegó a la etapa de blastocistos (tabla 4)

<b>Repetición</b>	<b>No. embriones evaluados</b>	<b>No. Blastocistos</b>	<b>% blastocistos.</b>
<b>REPETICIÓN 1</b>	107	10	9,35
<b>REPETICIÓN 4</b>	47	15	31,91
<b>REPETICIÓN 5</b>	132	55	41,67
<b>REPETICIÓN 10</b>	99	5	5,05
<b>TOTAL</b>	385	85	22,08

*Tabla 4 tasa de obtención de blastocistos*

### Discusión:

Según la literatura la tasa de maduración de ovocitos bovinos se encuentra entre el 85 y 90% (Ferré, y otros, 2019), siendo muy superiores a los obtenidos en este estudio, estas diferencias pueden deberse a las condiciones particulares de cada estudio, pues la tasa reportada corresponde a estudios realizados *in vivo*, con oocitos obtenidos mediante la técnica OPU, y no con ovarios obtenidos *post mortem* que deben pasar por un proceso de refrigeración y transporte antes de su procesamiento.

En cuanto a la fertilización, se reporta que la tasa de fertilización de ovocitos medidos en el clivaje es de 70-85% (Ferré, y otros, 2019), siendo un valor muy superior al obtenido en este estudio, esto puede deberse a falta de pulimiento de la técnica, sin embargo también debe considerarse que la evaluación de los posibles cigotos al día tres puede producir un estrés fuerte afectando la tasa de clivaje. Los cigotos alcanzan la activación del genoma embrionario al día cuatro *post FIV* y antes de este suceso, son más susceptibles a estrés, por lo que es posible que para futuros experimentos sea recomendable evaluar el clivaje al día cuatro o cinco con el fin reducir el estrés de los cigotos y aumentar la tasa de clivaje (Eduviges Burrola-Barrazaa & González-Ro, 2012). Al evaluar la obtención de blastocistos de alta calidad esta se encontró dentro de los rangos reportados en la literatura que oscilan entre el 20-40% (Ferré, y otros, 2019).

Estos hallazgos indican que dentro de los pasos de producción *in vitro* de los embriones hay una fluctuación desconocida entre la FIV y la revisión del clivaje, ya que en el último proceso posterior al clivaje sí logra obtener un porcentaje acorde con el estándar en bovinos para la obtención de blastocistos.

Se han reportado diferentes protocolos para cada uno de los procesos que en conjunto conllevan a producir embriones de buena calidad, se puede mejorar el desarrollo embrionario temprano *in vitro* con el uso de melatonina como antioxidante en células gaméticas (Gutiérrez-

Añez, y otros, 2021), también se ha propuesto que el uso de luz infra roja en rangos de 600 a 1000 nm ayuda a mejorar la actividad metabólica celular en la cadena de respiración mitocondrial (Kendall, Matt, Bridges, & Checure, 2023), siendo dos aspectos que podrían ayudar a mejorar la línea de producción de embriones. También ha descrito que la tensión baja de oxígeno de 5% ayuda a mejorar la competencia de ovocitos frente a una alta del 20% (Bermejo-Alvarez, Lonergan, Rizos, & Gutie , 2010).

Las limitantes en este momento radican en que es un proceso que se dificulta gracias a la cantidad de materiales que se necesitan para producir un embrión y el costo de los mismos, aunque si se produjeran a gran escala se podría lograr mitigar el peso de los costos (Restrepo Betancur & Grupo de Investigación en Biotecnología Aplicada. , biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia, 2008; Díaz Pazmiño & Hurtado , 2010). Por otro lado tenemos la falta de entendimiento de algunos procesos que pueden interrumpir la división celular en el embrión como la activación del genoma embrionario y también los problemas que se relacionan con los individuos producidos *in vitro* como el gigantismo o el cordón umbilical extra largo (Eduviges Burrola-Barrazaa & González-Ro, 2012), a raíz de esto se considera que deben haber otros factores desconocidos que repercuten en la vida del individuo que es producido *in vitro* hasta el estadio de blastocisto.

Es de vital importancia continuar la investigación para mejorar cada uno de los pasos de la PIVE dentro del laboratorio ya que se espera que se logre ingresar y mejorar los rangos estándar de la PIVE actual, así ser más eficientes y poder contribuir a una mayor rentabilidad del proceso y generarle una entrada importante de mejora genética a los diferentes productores que deseen mejorar sus hatos y producción derivada de la ganadería.

### **Conclusiones:**

La producción *in vitro* de embriones bovinos es una alternativa importante que permite obtener animales de mérito genético en pocas generaciones y permite a la industria ganadera mejorar sus estándares de producción y la calidad.

La PIVE, a pesar de que ha avanzado mucho en los últimos años, requiere perfeccionar las técnicas que se le atribuyen a la formación del embrión como lo son la maduración, la fertilización y el cultivo. Es importante que las técnicas mejoren y que sea posible tener menores costos de producción por embrión, así como también se vuelve representativa la necesidad de mejorar los medios de cultivo, mejorando así las tasas de clivaje y de obtención de blastocistos de alta calidad. La formación de nuevos protocolos y de diferentes herramientas tecnológicas pueden aumentar la eficiencia de la PIVE en gran medida.

## Bibliografía

- FAO. (2023). *organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura*. Obtenido de Fao fiat panis: <https://www.fao.org/animal-production/es#:~:text=El%20ganado%20contribuye%20a%20casi,personas%20en%20todo%20el%20mundo>
- FAO. (2023). *organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura*. Obtenido de FAO fiat panis: <https://www.fao.org/animal-genetics/global-policy/es/>
- Luis B. Ferré, M. E.-C. (2020). Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. En *reproduction in domestic animals* (págs. 659-676). wiley.
- Seneda, B. V. (2013). Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived Bosindicus embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*.
- IETS. (2023). *IETS.org*. Obtenido de International Embryo Technology Society: <https://www.iets.org/>
- Ruiz, S. (2010). Ovum Pick Up (OPU) en bovinos: aplicaciones en biotecnología de la reproducción. *Frisona Española*.
- Urrego Álvarez, R., & Restrepo, G. (2006). Implicaciones de la biotecnología reproductiva en la producción animal. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 78.
- Fernández, A., Díaz, t., & Muñoz, G. (2007). Producción In vitro de Embriones Bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 1(48), 51-60.
- Guerra, R., Sandoya, G., & de Armas, R. (2012). Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. *REDEVET. Revista Electronica de Veterinaria*(13), 10.
- Restrepo Betancur, G., & Grupo de Investigacion en Biotecnologia Aplicada. . (2008). *biotecnologías reproductivas aplicables a la producción bovina en colombia*. Medellín: Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.
- Díaz Pazmiño, C. A., & Hurtado , F. A. (2010). Evaluación de la viabilidad y el desarrollo de embriones bovinos obtenidos por fertilización in vitro incubados en oviductos ovinos. 63.
- Amilcar Bo, G., & Mapletoft, R. J. (2018). Evaluation and classification of bovine embryos. *AR*, 10(3), 244-348.
- Restrepo Betancur, G., Gutiérrez, N. C., & Araque, N. A. (2007). Efecto de la suplementación con suero fetal bovino para la maduración in vitro de oocitos bovinos sobre su actividad mitocondrial y desarrollo e. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(2), 14-22.
- Youngs, C. R., Leibo, S. P., & Godke, C. V. (2010). Embryo cryopreservation in domestic mammalian livestock species. *CABI Reviews*, 1-11.
- Puerta Gómez, L. F. (2006). Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular OPU y fecundación in vitro FIV como herramienta para un mejor aprovechamiento echamiento de las hembras o de las hembras cebuinas dentro del plan de o del plan de modernización del h. *Universidad de La Salle Ciencia Unisalle*.
- Gutiérrez-Añez, J. C., Henning, H., Lucas-Hahn, A., Baulain, U., Aldag, P., Sieg, B., & Hensel, V. (2021). Melatonin improves rate of monospermic fertilization and early embryo development in a bovine IVF system. *Plos one*, 16(9).
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2019). Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004.
- Camargo, L. S., Viana, J. H., Sá, W. F., Ferreira, A. D., Ramos, A. D., & Vale Filho, V. R. (2018). Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, 3(1), 19-28.
- Lane, M. (2001). Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology*, 55(1), 225-236.

- Celestinos, M., & Gatica, R. (2002). Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34(2), 157-165.
- Colazo , M., & Mapletoff, R. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*.
- Segura-Correa, J. C., & Montes-Pérez, R. C. (2001). Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *REVISTA BIOMÉDICA*, 12(3), 196-206.
- Bermejo-Alvarez, P., Lonergan, P., Rizos, D., & Gutie , A. (2010). Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reproductive biomedicine online*, 20, 341-349.
- Peláez Peláez, V. A. (2011). PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS.
- García Recillas, J., & Martí, J. L. (2013). Implementación de un protocolo de Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. *Escuela Agrícola Panamericana; Zamorano Honduras*.
- Kendall, R., Matt, H., Bridges, W., & Checura, C. M. (2023). Using Photobiomodulation to Improve Bovine Oocyte Maturation. *Journal of Animal Science*, 101(Supplement\_1), 24-25.
- Gonella Diaza, Á. M., Atuesta, J. E., Bernal Ulloa, S. M., & Chacón Jaramillo, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(1), 65-80.
- Eduviges Burrola-Barrazaa, M., & González-Ro, E. (2012). Efectos de los RNAm maternos sobre la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano en mamíferos. Revisión. *Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 6(1), 39-68.