

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación de medios de cultivo de fabricación casera en la producción de embriones *in vitro* en bovinos

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autor:

Luis Miguel Cajilema Paidá

Director:

Luis Eduardo Ayala Guanga

ORCID:  0000-0001-6543-7594

Cuenca, Ecuador

2024-07-25

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de medios de cultivo *in vitro* producidos en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarios, frente a un medio comercial. Se recolectaron ovarios del Camal Municipal de Cuenca hasta completar 200 ovocitos por cada tratamiento. Los COC's clasificados como aptos (A y B) fueron madurados por 24 horas, luego los COC's que presentaron expansión de sus células del cúmulo fueron colocados en medio de fecundación por 24 horas. A continuación, los COC's se denudaron y los ovocitos que presentaron clivaje fueron utilizados para el presente estudio, siendo distribuidos aleatoriamente en los tres tratamientos (T1=CR2; No comercial 1; T2=SOF; No comercial 2; T3=Comercial; testigo), por 7 días luego de los cuales se valoró el número de embriones, su estadio y calidad en cada uno de los tratamientos. Los resultados indicaron que, el porcentaje de embriones obtenidos en forma general sin considerar los tratamientos fue del 41% al final de la producción de embriones *in vitro* (PIVE). Los medios CR2 y SOF (no comercial) proporcionaron mejores porcentajes de embriones de calidad excelente al final de la PIVE (43,6 % CR2 y 36,8 % SOF), en comparación con el comercial (testigo) con diferencia estadística ($P<0,05$). El presente estudio demostró que los medios de cultivo *in vitro* preparados en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad de Cuenca proporcionaron resultados tan o más efectivos que los medios comerciales.

Palabras clave del autor: ganado bovino, fertilización *in vitro*, cultivo *in vitro*, medios de cultivo



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the efficiency of in vitro culture media produced in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, compared to a commercial medium. Ovaries were collected from the Cuenca Municipal Camal until 200 oocytes were completed for each treatment. The COC's classified as suitable (A and B) were matured for 24 hours. Then, the COCs that showed expansion in their cumulus cells were placed in the fertilization medium for 24 hours. Subsequently, the COC's were denuded and the oocytes that presented cleavage were used for the current study, being randomly distributed in the three treatments (T1=CR2; Non-commercial 1 1; T2=SOF; Non-commercial 2; T3=Commercial; witness) for 7 days. After 7 days, the number of embryos, their stage and quality were assessed in each of the treatments. The results indicated that the percentage of embryos obtained, in general and without considering the treatments, was 41% at the end of in vitro embryo production (PIVE). The CR2 and SOF (non-commercial) media provided better percentages of embryos of excellent quality at the end of the PIVE (43.6% CR2 and 36.8% SOF), compared to the commercial (control) with a statistical difference ($P < 0.05$). The present study demonstrated that the in vitro culture media prepared in the Biotechnology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, University of Cuenca provided results as or more effective than commercial media.

Author Keywords: cattle, *in vitro* fertilization, *in vitro* culture, culture media



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

1. Introducción	10
2. Objetivos.....	12
2.1 Objetivo general:.....	12
2.2 Objetivos específicos:	12
3. Revisión bibliográfica	13
3.1 Impacto del manejo de los embriones <i>in vitro</i> en la reproducción bovina.....	13
3.2 Importancia de los embriones <i>in vitro</i> bovinos en el mejoramiento genético	13
3.3 Biotecnología del manejo de embriones <i>in vitro</i> a nivel mundial	13
3.4 Biotecnología del manejo de embriones <i>in vitro</i> a nivel local - Ecuador	13
3.5 Métodos de recolección post mortem de ovocitos bovinos	14
3.6 Uso de tejido y órganos reproductores post mortem del camal para la reproducción. 14	
3.7 Manejo de ovarios y óvulos post mortem.....	14
3.8 Extracción y recuperación de ovocitos	15
3.9 Clasificación según la calidad de los ovocitos	15
3.10 Células de cúmulo	16
3.11 Fertilización <i>in vitro</i> y maduración de embriones.....	16
3.11.1 Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	16
3.12 Medios de cultivo para la maduración embrionaria <i>in vitro</i>	18
3.12.1 Origen de los medios de cultivo	18
3.12.2 Tipos de medios de cultivo	18
3.13 Desarrollo embrionario	18
3.13.1 Evaluación y clasificación de los embriones.....	19
3.13.2 Calidad embrionaria	20
4 Materiales.....	22
4.1 Materiales biológicos	22
4.2 Materiales químicos	22
4.3 Materiales de laboratorio.....	23
4.4 Ubicación del experimento.....	24
4.5 Unidad experimental	24
4.6 Diseño experimental:	25
4.7 Métodos.....	25
4.7.1 Recolección de ovarios, aspiración folicular y obtención de COC's	25

4.7.2	Maduración <i>in vitro</i>	26
4.7.3	Fecundación <i>in vitro</i>	26
4.7.4	Cultivo <i>in vitro</i>	27
4.7.5	Valoración de la cantidad y calidad de embriones	27
4.8	Análisis Estadístico	28
	Resultados y discusión	29
5	Porcentaje de embriones obtenidos en forma general en el estudio.....	29
5.1	Estadio y calidad de embriones obtenido en forma general en el estudio	30
5.2	Porcentaje de embriones obtenidos en cada uno de los tratamientos en estudio .	31
5.3	Estadio de los embriones obtenidos en los diferentes tratamientos	32
5.4	Calidad de los embriones obtenidos en los diferentes tratamientos	33
	Conclusiones	34
	Recomendaciones	35
	Referencias.....	36

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis, parroquia Victoria del Portete.....	24
Figura 2. Porcentaje de embriones obtenidos al finalizar el proceso de la producción de embriones <i>in vitro</i> (41%) embriones viables, sin considerar tratamientos.....	29
Figura 3. Porcentaje de embriones en diferentes estadios de desarrollo: Ba=blastocistos; BaE=blastocistos expandidos; BaP=blastocistos protruidos (Panel A). Calidad de los embriones (Excelente; Bueno; malo) expresada en porcentaje (Panel B). Datos generales sin considerar tratamientos.....	30
Figura 4. Porcentaje de embriones obtenidos al final de la producción de embriones <i>in vitro</i> en los tres tratamientos en estudio. Prueba de Chi cuadrado al 5%. *=diferencia entre tratamientos en producción de embriones <i>in vitro</i>	31

Índice de tablas

Tabla 1. Estados de desarrollo para los embriones bovinos <i>in vitro</i>	19
Tabla 2. Porcentaje del estadio de los embriones obtenidos con un determinado medio de cultivo <i>in vitro</i>	32
Tabla 3: Porcentaje de la calidad de los embriones obtenidos con un determinado medio de cultivo <i>in vitro</i>	33

Dedicatoria

Dedico este trabajo de tesis a mis padres Ricardo y Alejandrina porque siempre he contado con su apoyo incondicional por sus enseñanzas que me ha impulsado a crecer como ser humano.

De manera muy especial mis tíos Nube, Zoila, Miriam, Silvia, Elsa, por brindarme sus palabras de aliento para no dejarme vencer.

A mi novia Denisse quien estuvo a mi lado durante toda mi carrera universitaria por apoyarme incondicionalmente por ser esa persona que siempre creyó en mi y motivarme a superarme.

Luis Cajilema

Agradecimiento

Agradezco a Dios por tenerme con salud y vida a mis papas Ricardo, Alejandrina y Martha quienes han sido un ejemplo a seguir y por ser esas personas que siempre creyeron en mi. A toda mi familia por motivarme a seguir adelante y estar presentes a lo largo de mi vida universitaria. A mi novia por ser parte de este camino y me ha impulsado a lograr mis objetivos.

A mi tutor de tesis Dr. Luis Ayala por brindarme todo su apoyo ya que ha sido como un amigo en todo momento y estoy eternamente agradecido por su dedicación, tiempo y conocimientos durante todo este proceso de investigación. Al Dr. Xavier Samaniego por brindarme toda su confianza y guiarme con sus conocimientos en la elaboración de mi trabajo experimental.

Por último, a todos los que formaron parte de este logro que es muy importante, totalmente agradecido los aprecio.

Luis Cajilema

1. Introducción

La producción de embriones *in vitro* en bovinos (PIVE) está en crecimiento, a tal punto que en el 2021 se llegó a producir 1'521.018 embriones con un incremento del 31,5% con respecto al 2020 (Viana, 2022). Por tal motivo, se vuelve fundamental optimizar los procesos para incrementar la cantidad y calidad de embriones producidos mediante esta biotécnica (Sirard, 2018).

En este contexto, la mayoría de los laboratorios comerciales (Pontes et al., 2011) así como los de investigación, han desarrollado y optimizado los protocolos y medios de maduración *in vitro*, mismos que generalmente tienen como base el TCM 199 suplementado con hormonas y suero fetal bovino (Younis et al., 1989). En el proceso de fertilización el descubrimiento de la heparina como factor de capacitación espermática fue un logro relevante y hoy se utiliza con frecuencia en el medio de fertilización (Parrish, 2014).

Además, en los medios de cultivo *in vitro* se han utilizado el SOF (Fluido Oviductual Sintético) con suplementación de albúmina sérica bovina, piruvato aminoácidos, citrato, mioinositol y con el uso o no de suero fetal bovino, esto ha permitido obtener tasas de producción de blastocistos entre el 20-40% (Ferré et al., 2020).

En la mayoría de los laboratorios del mundo los medios utilizados para la maduración, fecundación y cultivo *in vitro* son comerciales; es decir, son formulas testadas que se encuentran patentadas y disponibles. Sin embargo, los altos costos que tienen estos medios, sumado a las restricciones y aranceles de importación en algunos países, especialmente en aquellos en vías de desarrollo como el nuestro (Ecuador); así como las condiciones y tiempos de almacenamiento de los medios una vez que se abren encarecen el producto final (embrión producido), estas particularidades han llevado a que varios laboratorios comiencen a fabricar y estandarizar sus propios medios de maduración (MIV), fecundación (FIV) y cultivo *in vitro* - CIV (Palasz & De la Fuente, 2008).

En la actualidad existe evidencia científica que ha demostrado la eficiencia de los medios producidos a nivel de laboratorios a los cuales los llamaremos “no comercial”, con los cuales se ha llegado a obtener resultados similares a los que se lograron con medios comerciales en la especie humana (Ghiasi, 2014) y en ratones (Kim et al., 2011). En la especie bovina se ha demostrado la efectividad de medios no comercial, comparados con medios comerciales,

observado tasas de maduración entre el 70 – 80%, rango considerado como aceptables (Ferré et al., 2020; Sánchez Sánchez, 2014; Velásquez-Penagos et al., 2018)

En la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, el laboratorio de biotecnología se ha impulsado la producción de embriones *in vitro*, mediante la utilización de medios comerciales financiados por diversos proyectos. Sin embargo, al tratar de continuar con la producción de embriones *in vitro* con este tipo de medios se ha encontrado un gran problema en la compra e importación de estos medios comerciales, lo cual impide el desarrollo de las actividades de este laboratorio. Por tal motivo, se realizó un estudio para probar medios de maduración y fecundación producidos en el laboratorio de biotecnología vs., medios comerciales llegando a obtener resultados similares; sin embargo, el cultivo *in vitro* aún no se ha valorado estos medios no comercial, por lo que, fue necesario completar el proceso de producción de embriones *in vitro* con un estudio que valoré los medios no comercial de cultivo *in vitro* vs., medios comerciales, con la finalidad de estandarizar un protocolo de PIVE con medios propio elaborado dentro del laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

Valorar la eficiencia de los medios de cultivo *in vitro* producidos en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarios, frente a medios comerciales.

2.2 Objetivos específicos:

- Cuantificar el número y estadio de desarrollo de los embriones obtenidos a los 7 días al utilizar medios de cultivo *in vitro* no comercial.
- Evaluar la calidad de los embriones de bovinos obtenidos *in vitro*.

3. Revisión bibliográfica

3.1 Impacto del manejo de los embriones *in vitro* en la reproducción bovina.

El impacto del manejo de embriones *in vitro* dentro de la reproducción bovina, ha contribuido en la biotecnología y en producción de nuevos individuos para los programas de mejoramiento genético, además de generar modelos de investigación que tienen un impacto significativo en la industria ganadera y el incremento de su productividad, tanto por la recuperación de ovocitos de animales de alto valor genético *in vivo* (Gonella et al., 2013), como de ovocitos recuperados de ovarios procedentes de mataderos (Quispe et al., 2018).

3.2 Importancia de los embriones *in vitro* bovinos en el mejoramiento genético

Los embriones *in vitro* representan una herramienta crucial en la mejora genética del ganado bovino, dado que estos permiten la multiplicación de individuos valiosos, acelerando el progreso genético y maximiza la propagación de características deseables, como la producción de leche, la calidad de la carne y la resistencia a enfermedades; además, mediante la utilización de técnicas de reproducción asistida en bovinos se puede superar limitaciones biológicas como animales de edad avanzada o fisiológicas como problemas estrales, que podrían afectar la reproducción natural (Rosete et al., 2021). En la actualidad existe más evidencia que los factores ambientales son causantes de alteraciones en los procesos reproductivos, afectando directamente la calidad embrionaria (Enríquez, 2022).

3.3 Biotecnología del manejo de embriones *in vitro* a nivel mundial

A nivel mundial, la biotecnología de manejo de embriones *in vitro* ha revolucionado la industria ganadera, donde países como Estados Unidos, Brasil y Australia, lideran en las investigaciones en este tema y han adoptado a su uso ya a nivel comercial y masivo, lo que representa un aumento exponencial de animales de alto valor genético y mayor productividad (Enríquez, 2022).

3.4 Biotecnología del manejo de embriones *in vitro* a nivel local - Ecuador

A nivel local, la adopción de técnicas de manejo de embriones *in vitro* varía según las condiciones socioeconómicas, culturales y de infraestructura de cada región, donde el acceso a estas tecnologías puede ser limitado debido a restricciones tecnológicas sobre todo en la región sierra donde los sistemas de producción son extensivos y poco tecnificados, frente a sistemas más intensivos que han empezado a optar por estas tecnologías en busca mejorar

sus sistemas en programas de mejoramiento de ganadería de leche, e inclusive esta tecnología se viene adaptando a especies endémicas como alpacas y guanacos (Huanca, 2022).

3.5 Métodos de recolección post mortem de ovocitos bovinos

Existen dos métodos para recolectar ovocitos bovinos, el primero obtiene ovocitos post mortem de ovarios de matadero y el segundo recupera las gametas de animales vivo. Estas técnicas han utilizadas ampliamente para mejorar la producción *in vitro* de embriones y como modelo experimental; sin embargo, estos estudios necesitan ser validados con ovocitos obtenidos de ovarios post mortem (Alvarado et al., 2020).

3.6 Uso de tejido y órganos reproductores post mortem del camal para la reproducción

El uso de tejido y órganos reproductores post mortem procedentes del camal es una estrategia innovadora en la reproducción bovina, dado que este enfoque aprovecha el material genético de animales sacrificados en mataderos para la obtención de gametas y tejidos reproductivos, donde los óvulos recuperados de los ovarios post mortem pueden ser utilizados para la producción de embriones *in vitro* (Alvarado et al., 2020).

3.7 Manejo de ovarios y óvulos post mortem

Específicamente el manejo de ovarios y óvulos post mortem requiere un protocolo cuidadosamente diseñado para garantizar la viabilidad y calidad de los gametos recuperados, así como las garantías que protejan al operario, por lo que es crucial minimizar el tiempo transcurrido entre la extracción del tejido y el procesamiento, así como mantener condiciones adecuadas de temperatura y pH para preservar la integridad celular. Además, se deben emplear técnicas de lavado y selección de gametas para eliminar posibles contaminantes y asegurar la obtención de células reproductivas viables (Vilchis, 2011).

Este material debe ser utilizado y almacenado en condiciones ambientales específicas, con pH entre 7,4 a 7,6 y temperaturas entre los 25 a 30°C, en donde lo más recomendable es que se generen medios similares a los fluidos cervicales del bovino (Fernández et al., 2007); además, se recomienda soluciones de recolección o medios de recogida compuestos por sales como: NaHCO₃; Glutamina y la adición de antibióticos como Penicilina y Estreptomicina para garantizar la inocuidad y viabilidad del tejido, en este caso del ovocito (Ahuja, 2009).

3.8 Extracción y recuperación de ovocitos

La extracción y recuperación de óvulos post mortem generalmente implica el manejo cuidadoso de los mismos. Estos folículos son procesados para la extracción de óvulos, y pueden ser utilizados inmediatamente en procesos de fertilización *in vitro* o criopreservados para su uso futuro, por lo que es importante emplear técnicas de manipulación y cultivo celular estériles para evitar la contaminación y preservar la viabilidad de los óvulos recuperados (Enríquez, 2022). La maduración y viabilidad de los ovocitos se ve directamente influenciada por las condiciones ambientales de conservación y transporte, por el estado fisiológico de la donante (Ferré et al., 2020).

La producción de embriones *in vitro* (PIV) implica la obtención de ovocitos de un grupo heterogéneo de folículos antrales de 2 a 8 mm de tamaño, que incluyen folículos de ondas foliculares no ovulatorias y ovulatorias, así como folículos dominantes y subordinados en estas ondas (Ferré et al., 2020).

3.9 Clasificación según la calidad de los ovocitos

La clasificación de ovocitos se basa en un orden cualitativo en base al estado de maduración y la calidad de las células que lo conforman (Ayala et al., 2020).

La evaluación de la calidad de los ovocitos variará entre laboratorios. La mayoría considera que los grados 1 y 2 son viables, pero a menudo incluyen los grados del 1 al 4 en la maduración *in vitro*. Se espera que los ovocitos de mayor calidad tengan tasas de producción de embriones más altas. El control de calidad y los procedimientos de laboratorio deben ser rigurosos para garantizar una alta correlación entre los grados de COC's y las tasas de producción de embriones *in vitro* (Demetrio et al., 2020).

Se pueden observar variaciones en la densidad y/o granulación de los ovocitos en diferentes razas de ganado, con variaciones en la dieta y el estado metabólico del donante (por ejemplo, vacas en lactancia). Se puede observar una conformación irregular de la zona pelúcida, pero, en ausencia de otras características degenerativas, eso solo no es motivo para rebajar un ovocito o COC's (Demetrio et al., 2020).

Las pautas para evaluar ovocitos descritas aquí tienen como objetivo ser empleadas en la industria y en la literatura. Se recomienda que los investigadores que publiquen datos basados en un sistema de clasificación de ovocitos diferente describan cómo se desvía de estas pautas en la sección de materiales y métodos. Se reconoce que algunos laboratorios

hacen referencia a los grados de ovocitos usando letras y que, a menos que se especifique lo contrario, los grados A-D son equivalentes a los grados 1-4 (Demetrio et al., 2020).

3.10 Células de cúmulo

Las células de cúmulo (COC's) rodean al ovocito en desarrollo dentro del folículo ovárico y desempeñan un papel crucial en su maduración y calidad, donde la presencia y la morfología de las COC's pueden ser indicadores importantes de la viabilidad del ovocito, ya que estas células proporcionan soporte nutricional y señales de desarrollo al ovocito durante su crecimiento (Soto et al., 2019).

Las tasas de recuperación de COC's en los protocolos que incluyen hormonas reproductivas muestran similitudes en las líneas bovinas donde el mayor efecto la tiene la LH sobre FSH, generando variaciones en los porcentajes de recuperación entre el 50-60%, donde los COC's son mayores en OPU, y donde las diferencias en los resultados podrían atribuirse al protocolo de estimulación, la raza, la experiencia del operador y el manejo de los animales (Ayala et al., 2020).

3.11 Fertilización *in vitro* y maduración de embriones bovinos

3.11.1 Fecundación *in vitro* (FIV)

Los avances en la tecnología de reproducción asistida han permitido el desarrollo de herramientas para la producción de embriones *in vitro* (PIV) en la reproducción animal. Estas técnicas se centran en maximizar el número de crías a partir de animales genéticamente superiores y se utilizan para diversas finalidades, como la multiplicación de animales de alto valor genético, y la conservación del germoplasma de especies amenazadas. La transferencia de embriones producidos *in vitro* ha experimentado un crecimiento significativo, superando en número a los embriones producidos *in vitro* en algunos casos. Se ha observado un aumento en la transferencia de embriones congelados producidos *in vitro* en comparación con embriones frescos, posiblemente debido al desarrollo de medios de cultivo avanzados y a la mejora de la eficiencia de los procedimientos de PIVE. Además, la combinación de tecnologías de selección genómica con técnicas de producción de embriones *in vitro* ha demostrado maximizar la ganancia genética en el ganado (Ferré et al., 2020).

Para preservar los embriones de alto valor genético, se ha utilizado métodos de criopreservación. En 1973, nació el primer ternero a partir de un embrión por esta técnica. A partir de ese momento han aumentado las investigaciones enfocadas en el desarrollo de técnicas más modernas como son la producción de embriones *in vitro*, la micromanipulación

de embriones, sexado embrionario, ingeniería genética, y algunas otras (Callesen et al., 2019; Noga & Looney, 2021).

En 1978, nace el primer ternero producido a partir de una fertilización *in vitro* (FIV). Luego, en la década del 80, esta técnica fue creciendo exponencialmente y encaminó el trabajo para investigaciones posteriores de este tipo (Nowicki, 2021). El término FIV lleva implícito la producción de los embriones en un entorno artificial controlado, que facilita la maduración, así como la interacción entre los gametos de ambos sexos, para que se produzca la fertilización del óvulo y luego se continúe su desarrollo *in vitro*. La FIV es considerada una de las técnicas de reproducción asistida con más éxito, puede ser empleado con fines investigativos, para el mejoramiento genético, desarrollar nuevas técnicas de reproducción asistida, y por supuesto con un objetivo comercial (Salgado & Lopera, 2020).

Los recursos y protocolos que se emplean cotidianamente para la FIV en bovinos no han sido marcadamente modificados. Los espermatozoides tienen que ser capacitados para poder fertilizar los ovocitos durante este proceso. La capacitación de los mismos incluye modificar la membrana espermática y realizar cambios en la motilidad del gameto. La capacitación es inducida con suplementos de agentes de capacitación a los medios de fecundación en dependencia de las características propias del esperma de cada animal. Entre los agentes de capacitación más empleados está la heparina. La heparina se vincula acopla con las proteínas del plasma seminal (BSP) y quita de la membrana plasmática, junto con los fosfolípidos asociados y el colesterol. La heparina disminuye la capacidad de los espermatozoides para excretar el calcio (Ca^{2+}) mediante la calcio-ATPasa. De la misma manera, ocurre una absorción de Ca^{2+} extracelular en el acrosoma, lo que provoca un aumento del calcio intracelular, unido a la salida de H^+ y penetración del HCO_3^- (Murillo, 2018).

El intercambio de HCO_3^- / H^+ producen un incremento del pH intracelular (pHi) y una estimulación de la adenil ciclase soluble (ACs), de los espermatozoides. El AMPc resultante activa la proteína quinasa A, que estimula a su vez la tirosina quinasa e inhibe la tirosina fosfatasas, esto lleva a una transferencia de un grupo PO_4 desde el ATP a los residuos de tirosina de las proteínas (Murillo, 2018). Hace unos años se describió un nuevo fenómeno biológico vinculado a la capacitación de espermatozoides de mamíferos *in vitro*, que produce una redistribución de los iones de zinc en los espermatozoides (Kerns et al., 2018).

3.12 Medios de cultivo para la maduración embrionaria *in vitro*

La maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos inmaduros obtenidos de pequeños folículos antrales es una técnica prometedora para el tratamiento de la infertilidad o la preservación de la fertilidad en humanos, donde varios estudios han intentado mejorar las tasas de maduración ovocitaria y desarrollo embrionario. Por ejemplo, se ha demostrado un efecto beneficioso utilizando retinoides en el desarrollo embrionario en cabras. Los medios de maduración, suelen estar suplementados con diferentes tipos de proteínas, como suero bovino fetal, suero de cordón fetal o suero materno, que se cree contienen albúmina y otros componentes desconocidos que ayudan en la maduración ovocitaria (Kim et al., 2011).

3.12.1 Origen de los medios de cultivo

Los medios de cultivo para la maduración embrionaria *in vitro* pueden tener diferentes orígenes, incluyendo medios comerciales disponibles en el mercado y medios de fabricación no comercial desarrollados en laboratorios de investigación (Gamit et al., 2023).

3.12.2 Tipos de medios de cultivo

Existen diferentes tipos de medios de cultivo utilizados en la maduración embrionaria *in vitro*, que pueden variar en composición y formulación, donde algunos de los tipos más comunes incluyen medios simples basados en soluciones salinas, medios complejos que contienen suero fetal bovino (SBF) u otros componentes biológicos, y medios definidos que contienen nutrientes y factores de crecimiento sintéticos. La elección del medio de cultivo adecuado dependerá de factores como el tipo de células a cultivar, los objetivos del experimento y las preferencias del investigador (Kim et al., 2011).

La investigación centrada en la comunicación entre el embrión y el ambiente materno es crucial para entender y aprovechar los factores maternos que influyen positivamente en el desarrollo embrionario. Aunque se han reportado nuevas tecnologías mejoradas para la selección de espermatozoides y embriones, las cuales han demostrado mejorar la fertilidad y las tasas de concepción, aún se requiere de más datos para validar completamente estos avances (Ferré et al., 2020).

3.13 Desarrollo embrionario

A partir de ocurrida la fecundación y fusión de los pronúcleos del macho y la hembra, el huevo o cigoto comienza un período de divisiones mitóticas sucesivas, que se producen cada 24 horas aproximadamente. Esto se conoce como segmentación o clivaje, y lleva a la formación

de un blastocisto, que es el estadio embrionario que precede a la implantación (Jiménez, 2024).

En el ganado bovino, el periodo de cultivo embrionario es de 6 días, no obstante, si se incluye el momento de la fecundación, que es apenas unas horas previas al comienzo de la FIV, puede decirse que la formación de los blastocistos se produce a los siete días aproximadamente. En este momento, los que tengan mejor calidad se transfieren a hembras receptoras o pasan a criopreservación para emplearlos posteriormente (Bo & Mapletoft, 2013).

A pesar de esto ocurre que, no todos los embriones tienen la misma velocidad de desarrollo durante ese espacio de tiempo, por lo que, a los siete días posteriores a la FIV, pueden encontrarse mórlulas, blastocistos tempranos, blastocistos regulares, blastocistos expandidos y blastocistos eclosionados en el medio de cultivo utilizado. Mientras mayor sea el número de embriones con estadio más avanzado, se puede decir que el sistema *in vitro* empleado es de mejor calidad. Se considera el periodo de cultivo posterior a la FIV como la fase más crítica y será la que garantice o no la calidad de los blastocistos (Jiménez, 2024).

3.13.1 Evaluación y clasificación de los embriones.

Cuando se obtienen los embriones *in vitro*, seguidamente son evaluados con un estereoscopio, preferiblemente con aumentos entre 50 y 100x. Los embriones luego se clasifican según su estado de desarrollo (1-9) y calidad (1-4). Para esto, el estado de desarrollo se evaluó y comparó con el que tendría de presentar según el tiempo transcurrido (días de cultivo *in vitro* , Bo & Mapletoft, 2013).

Tabla 1. Estados de desarrollo para los embriones bovinos *in vitro*.

Estadio de desarrollo	Código	Descripción
Mórula	3	<ul style="list-style-type: none"> Mínimo 16 células donde es difícil diferenciar los blastómeros. Masa celular ocupa mayoría del espacio perivitelino.
Mórula compacta	4	<ul style="list-style-type: none"> Coalescencia de blastómeros individuales formando una masa compacta. Masa celular ocupa 60-70% del espacio perivitelino.
Blastocisto temprano	5	<ul style="list-style-type: none"> Presencia de blastocele. Embrión ocupa 70-80% del espacio perivitelino.

		<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para diferenciar el macizo celular interno de las células trofoblásticas.
Blastocisto	6	<ul style="list-style-type: none"> • Diferencia marcada entre la capa trofoblástica y el macizo celular interno. • Blastocoel prominente. • Embrión ocupa mayoría del espacio perivitelino.
Blastocisto compacto	7	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento del diámetro del embrión. • Adelgazamiento de la zona pelúcida
Blastocisto eclosionado	8	<ul style="list-style-type: none"> • Embriones eclosionados o exteriorizados de la zona pelúcida. • Pueden ser esféricos con blastocoel definido o pueden ser colapsados.
Blastocisto eclosionado expandido	9	<ul style="list-style-type: none"> • Embriones exteriorizados a la zona pelúcida y en expansión. • Morfológicamente similares a estado 8, pero con mayor diámetro.

Fuente: (Jiménez, 2024).

3.13.2 Calidad embrionaria

Este criterio está basado en las características morfológicas de los embriones, la calidad se categoriza en cuatro grados según Bo & Mapletoft (2013), citado por Jiménez (2024):

- **Excelente o bueno.** Tienen una masa celular simétrica y esférica. Blastómeras individuales uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión es consistente con la etapa de desarrollo esperada. Las irregularidades deben ser menores y al menos el 85% del material celular debe estar intacto. La zona pelúcida debe ser lisa y no tener en la superficie irregularidades que faciliten que el embrión se adhiera a las pajuelas. Los embriones grado 1 se denominan embriones transferibles.
- **Aceptables o regulares.** Muestran irregularidades moderadas en la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos el 50% de la masa embrionaria debe estar intacta. La supervivencia de estos embriones al procedimiento de congelación/descongelación es menor que la de los embriones de grado 1, pero las tasas de preñez son adecuadas si los embriones se transfieren en fresco a receptoras adecuadas. Estos embriones se consideran transferibles, pero no congelandos.
- **Malos.** Muestran importantes irregularidades en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las blastómeras. Al menos el 25% de la masa

embrionaria debe estar intacta. No sobreviven a la congelación/descongelación y las tasas de preñez son inferiores a las obtenidas con embriones de calidad regular si se transfieren en fresco.

- **Muertos o degenerados.** Se pueden presentar como embriones de una célula. No son viables y se descartan.

Materiales y métodos

4 Materiales

4.1 Materiales biológicos

- Ovarios de vaca
- Ovocitos
- Pajuelas

4.2 Materiales químicos

- Solución fisiológica
- Alcohol 70%
- Medio de maduración:
TCM 199, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), piruvato de sodio (0.2mM), FSH (25ug/ml), LH (5ug/ml), estradiol (2ug/ml), L-glutamina (2mM) y cisteamina (100uM) y amikacina (20ug/ml).
- Medio de fertilización:
FIV-TALP suplementado con 6mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), piruvato de sodio (0,2mM), heparina (20ug/ml) y PHE optimizado.
- Medios de cultivo no comercial 1
CR2 base (Rosenkrans et al., 1993) ,suplementado con 5mg/ml de BSA, 1mM de Alanina, 1mM de Glicina y 3% V/V de SFB.
- Medios de cultivo no comercial 2
SOFaaci-CS base (Holm et al., 1999), suplementado con piruvato de sodio 0,7mM, 0,34mM de ácido cítrico, 2,77mM de Myo-inositol, 0,34mM de L-glutamina, 4 mg/ml de BSA y 5% de SFB
- Medios de cultivo comercial 3
Medio CIV comercial Stroebechmedia, Hundested, Hovedstaden, Dinamarca (Stroebech et al., 2018).

4.3 Materiales de laboratorio

- Pipetas automáticas
- Placas Petri con cuadriculado
- Filtros de 0,22 micras
- Baño María
- Platina de calefacción
- Estufa de CO2
- Cámara de flujo laminar
- Tubos Falcon de 15 ml
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Porta y cubre objetos
- Estéreo microscopio (Microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de luz con lámpara de mercurio de alta presión C-SHG1, Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.)

4.4 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, la misma que se encuentra ubicada en la parroquia Victoria de Portete, a 2.663 m.s.n.m en la vía Cuenca-Girón km 23; latitud -3° 4' 48"y longitud -79° 4' 31", con una temperatura promedio entre 10 a 15 °C, y una precipitación media anual de 789 mm.

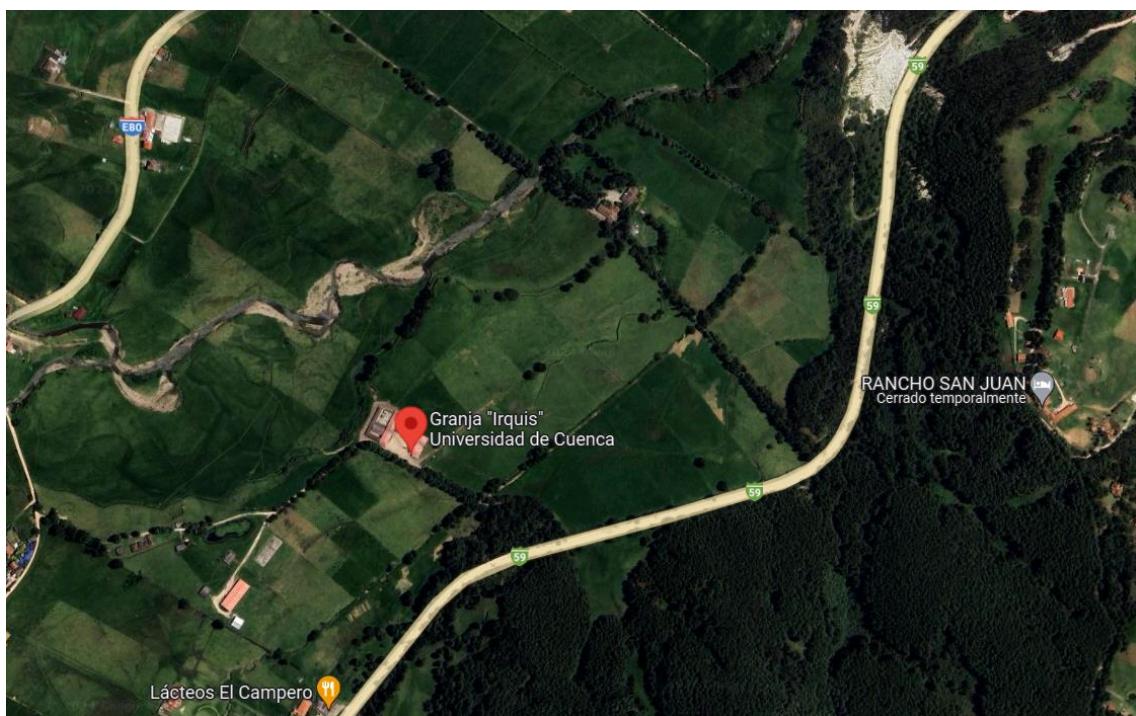


Figura 1. Ubicación satelital del Laboratorio de Biotecnología en la Granja Irquis, parroquia Victoria del Portete.

Fuente: Directorio cartográfico de Google Maps (2024).

4.5 Unidad experimental

Se colectaron 1.979 COC's aptos (calidad A y B) de la especie bovina, obtenidos por aspiración folicular de ovarios procedentes del matadero Municipal de Cuenca "EMURPLAG". Los COC's que ingresaron al proceso de maduración *in vitro* (MIV) fueron considerados aptos de acuerdo al criterio propuesto por Ayala et al. (2020b). Brevemente, dentro de los COC's categorizados como "aptos" se encontraban los COC's de tipo A (ovocitos de apariencia compacta, con varias capas de células, granulosa adherida, citoplasma homogéneo, denso y finamente granulado) y los de tipo B (usualmente granulosa adherida, cúmulo compacto con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida, citoplasma irregular,

denso y granulado). Los de tipo C (cúmulo parcial o completamente expandido y disperso, presencia de material extracelular, cúmulo descolorido, corona radiata desnuda, granulado grueso, mezcla de áreas muy claras o muy oscuras, citoplasma descolorido y deformé), fueron determinados como “no aptos” para la producción de embriones *in vitro* (PIVE) y fueron desechados.

Para la fecundación *in vitro* (FIV) se utilizaron únicamente los COC's que mostraron expansión completa de las células del cúmulo (1.070 COC's). Luego de 24h del proceso de la FIV se realizó la valoración de la fecundación mediante la observación del clivaje. Finalmente, un total de 584 ovocitos mostraron división celular y fueron repartidos aleatoriamente en los tres tratamientos en el presente estudio.

4.6 Diseño experimental:

El estudio fue experimental, en el cual se valoraron dos medios de cultivo *in vitro* de fabricación no comercial: T1 y T2, frente a un medio comercial como testigo (T3). Por lo tanto, la variable independiente fue el medio de cultivo *in vitro* y las variables dependientes valoradas fueron: número de embriones obtenidos a los 7 días y calidad de estos. Los tratamientos propuestos para el cultivo *in vitro* fueron:

- T1 (No comercial)= CR2 base propuesta por Rosenkrans et al. (1993) al cual se supplementó 5mg/ml de BSA, 1mM de alanina, 1mM de glicina y 3% V/V de SFB.
- T2 (No comercial)= SOFaaci-CS base propuesta inicialmente por Holm et al., (1999), supplementado con piruvato de sodio 0,7mM, 0,34mM de ácido cítrico, 2,77 mM de Myo-inositol, 0,34mM de L-glutamina, 4 mg/ml de BSA y 5% de SFB.
- T3 (Comercial)= Medio CIV comercial Stroebechmedia, Hundested, Hovedstaden, Dinamarca (Stroebech, 2015).

4.7 Métodos

4.7.1 Recolección de ovarios, aspiración folicular y obtención de COC's

Los ovarios fueron recolectados del Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP) dos veces por semana hasta completar los ovocitos necesarios por cada tratamiento (T1; T2 y T3). Los ovarios se transportaron en solución fisiológica a temperatura entre 30 - 35°C, hasta el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal ubicado en la Granja Irquis en un tiempo no mayor a cuatro horas.

En el laboratorio, el tejido adyacente a los ovarios (cuernos uterinos, ligamentos, segmentos de oviducto, etc.) fue removido con una tijera cuidando de no romper los folículos de la

superficie ovárica. Inmediatamente los ovarios se lavaron con cloruro de sodio al 0,9 % estéril, atemperado a 37,5°C, tres veces hasta que el contenido líquido resultó cristalino.

Después del lavado los ovarios se colocaron en una placa térmica hasta su procesamiento (37°C). Inmediatamente se procedió a la punción de los folículos que medían entre 2-8 mm, con aguja de calibre 18 G acoplada a una jeringa de 10 ml.

El líquido aspirado se depositó directamente en un tubo Falcón de 15 ml el cual fue colocado sobre la placa térmica. Una vez completada la aspiración folicular, se esperaron 15 minutos para que los COC's (complejos cúmulo ovocito) se depositaran el fondo del tubo, para luego retirar el sobrenadante con la ayuda de una pipeta volumétrica de 1ml.

El pellet o sedimento se colocó en una placa de búsqueda de 90 mm, este se extendió y con la ayuda de un estereomicroscopio (Nikon, SMZ745, Japón) se realizó la búsqueda y selección, según los criterios descritos por Ayala et al. (2020b), quienes agruparon los COC's en aptos (Tipos A y B) y no aptos (Tipos C).

4.7.2 Maduración *in vitro*

El proceso de maduración *in vitro* (MIV) se realizó en un medio que contenía TCM 199 como medio base, este fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), piruvato de sodio (0,2mM), FSH (25ug/ml), LH (5ug/ml), Estradiol (2ug/ml), L-glutamina (2mM) y cisteamina (100uM) y amikacina (20ug/ml).

La MIV se realizó en placas Petri de 35mm de diámetro, en la cual se colocaron microgotas de 70 μ l de medio MIV, en cada una de las cuales se ubicaron de 10 a 12 COC's, Estos fueron incubados en una estufa de CO₂ al 5 %, Humedad máxima y 38,8 °C de temperatura por 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas de la MIV, los COC's se observaron bajo una lupa estereoscópica y se valoró el grado de expansión de las células del cúmulo. Para la FIV se utilizaron únicamente los COC's que mostraron expansión total de las células del cúmulo.

4.7.3 Fecundación *in vitro*

Luego de las 24 horas de MIV se colocaron los COC's en un medio de FIV base, similar al propuesto por Parrish et al. (2014) con ciertas modificaciones. Este consistió en un medio FIV-TALP suplementado con 6 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), piruvato de sodio (0,2 mM), heparina (20 ug/ml) y PHE optimizado. Los COC's se colocaron en microgota de 70 μ l de medio de fertilización a razón de 10-12 COC's. La fecundación *in vitro* se llevó a cabo añadiendo 2×10^6 espermatozoides/ml a cada microgota. Los ovocitos se incubaron con los

espermatozoides durante 22-24 horas a 38,5°C y 5% de CO₂ en atmósfera de aire a máxima humedad.

4.7.4 Cultivo *in vitro*

Una vez concluida la FIV, los presuntos cigotos se removieron del medio y se denudaron mediante vórtex y estos fueron divididos aleatoriamente y por igual a los tres tratamientos (T1; T2 y T3). Los cigotos se cultivaron durante siete días en gotas de 70 µL en cajas Petri de 35 mm cubiertas con 4 ml de aceite mineral, bajo condiciones atmosféricas controladas (6,5 % de CO₂, 5 % de O₂ y 88,5 % de N₂ a 38,8 °C y máxima humedad.

Los tratamientos propuestos para el cultivo *in vitro* fueron:

T1 (No comercial)= CR2 base(Rosenkrans et al., 1993), suplementado con 5 mg/ml de BSA, 1 mM de Alanina, 1 mM de Glicina y 3 % V/V de SFB.

T2 (No comercial)= SOFaaci-CS base (Holm et al., 1999), suplementado con piruvato de sodio 0,7 mM, 0,34 mM de ácido cítrico, 2,77 mM de myo-inositol, 0,34 mM de L-glutamina, 4 mg/ml de BSA y 5 % de SFB.

T3 (Comercial)= Medio CIV comercial Stroebechmedia, Hundested, Hovedstaden, Dinamarca(Stroebech, 2015).

4.7.5 Valoración de la cantidad y calidad de embriones

En el día 7 se verificó la cantidad de embriones obtenidos en cada tratamiento, así como, su grado de desarrollo (mórlulas, blastocistos tempranos, blastocistos, blastocistos expandidos, blastocistos protruidos) y la calidad (1=Excelente o bueno, 2=Regular, 3= Pobre o Malo y 4 = Degenerado o Muerto).

La evaluación de la calidad embrionaria se realizó de acuerdo con la integridad morfológica. El código I (excelente o bueno) correspondió a niveles muy bajos de irregularidad entre las células, una proporción de > 85 % de células embrionarias viables y una zona pelúcida redonda y desplegada.

El código II (justo) se caracterizó por un nivel medio de irregularidad entre las células y una proporción de células viable del 50 %.

El código III (pobre) presentó irregularidades en la forma del embrión y una proporción celular viable del 25 %.

El código IV (muerto o degenerado) son embriones o células muertas con división incompleta. De acuerdo con estos criterios, los embriones de Código I y Código II se consideraron de calidad transferible (Erdem et al., 2020).

4.8 Análisis Estadístico

La información fue tabulada en Microsoft Excel 2016. Los resultados se procesaron en SPSS versión 25. Se determinó la normalidad de datos mediante la prueba de Shapiro Wilks. De todas las variables se realizaron estadígrafos principales. Para evaluar las variables cuantitativas número y calidad de embriones se aplicó la prueba de ANOVA y para comparar las medias se utilizó Tukey al 5%. En la comparación del número y calidad de embriones obtenidos se empleó la prueba de Chi cuadrado al 5%.

Resultados y discusión

5 Porcentaje de embriones obtenidos en forma general en el estudio

El porcentaje de embriones viables obtenidos en al final del proceso de la PIVE en general sin considerar tratamientos fue del 41 % (Fig. 3), mientras que el 59 % fueron clasificados como embriones muertos o degenerados.

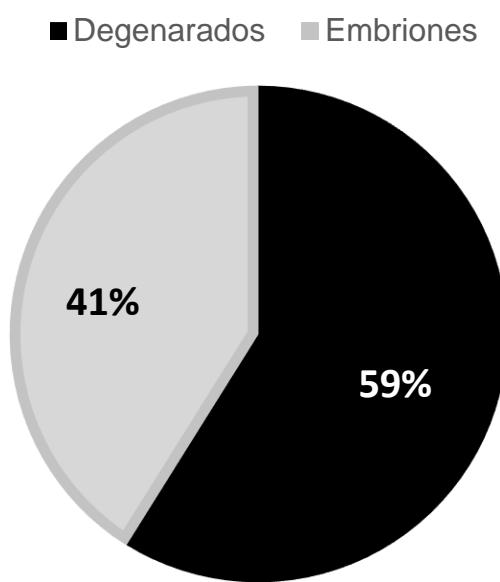


Figura 2. Porcentaje de embriones obtenidos al finalizar el proceso de la producción de embriones *in vitro* (41%) embriones viables, sin considerar tratamientos.

El porcentaje de embriones obtenido fue superior al descrito por Dimitros et al., (2002) al evaluar ovocitos provenientes de folículos de 2-6 mm, quienes determinaron un porcentaje de embriones viables del 31,7% al 7 día de cultivo *in vitro*. Esto permite asegurar que la secuencia de las fases de la producción de embriones *in vitro* (MIV, FIV y ahora CIV) realizada actualmente en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca se encuentran estandarizadas y muestran al final del proceso valores dentro de los parámetros internacionales.

5.1 Estadio y calidad de embriones obtenido en forma general en el estudio

Además, al observar el estadio de los embriones viables, se determinó un predominio de los blastocistos expandidos (BaE=52,9 %), seguidos de blastocistos protruidos (BaP=32,9 %) y finalmente con un 14,2% blastocistos propiamente dichos (Ba; Fig. 4; Panel A).

Al establecer la calidad de los embriones se clasificó como excelente al 48,8 % de estos y como de buena calidad a un 46,3 %, lo que suma un 95,0% de embriones viables con una calidad que permitiría su congelación, quedando solo un 5% de embriones con mala calidad que podrían ser usados solo para trasferencia en fresco (Fig. 4; Panel B).

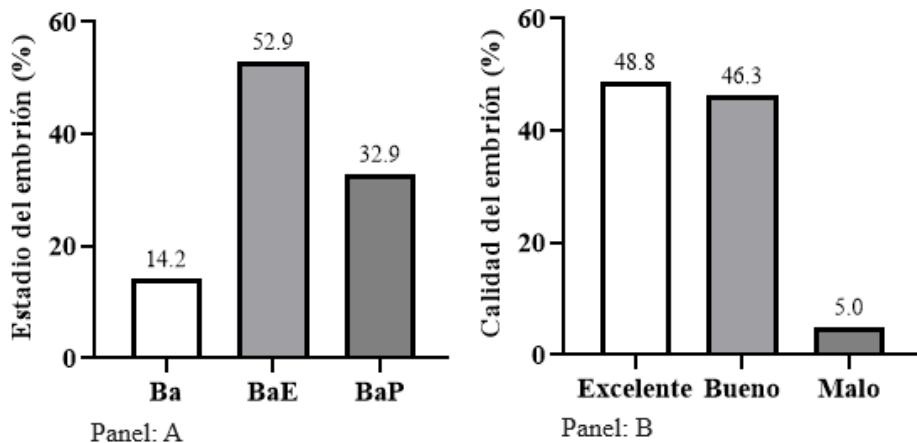


Figura 3. Porcentaje de embriones en diferentes estadios de desarrollo: Ba=blastocistos; BaE=blastocistos expandidos; BaP=blastocistos protruidos (Panel A). Calidad de los embriones (Excelente; Bueno; malo) expresada en porcentaje (Panel B). Datos generales sin considerar tratamientos.

Se encuentra descrito que al emplear ovocitos madurados *in vitro*, apenas entre un 30 y 40 % de los ovocitos tratados logran alcanzar el estadio de blastocisto (Lonergan & Fair, 2014). En el presente estudio se sobrepasó ligeramente ese valor.

Además, el número de blastocistos obtenidos al final de la PIVE en el presente estudio fue similar a trabajos realizados en otras investigaciones en el trópico bajo en la raza Holstein (46 %), usando ovocitos obtenidos por la técnica de aspiración ecoguiada (Carminatti et al., 2023).

Existe evidencia científica que describe que la preñez se incrementa cuando se usa un blastocisto de mayor edad (protruido) sin embargo, se presenta en este caso el problema de

su manejo ya que este pierde su zona pelúcida lo que hace que se vuelva más frágil, por lo que es más recomendable el uso de edades de blastocitos más tempranos como los expandidos y estos fueron los que más se obtuvieron en el estudio (Murillo, 2018).

5.2 Porcentaje de embriones obtenidos en cada uno de los tratamientos en estudio

Concluido los 7 días de cultivo *in vitro* (CIV) se observó que los medios no comerciales CR2 (44 %) y SOF (44,6 %) proporcionaron porcentajes similares de embriones viables ($p>0,05$); sin embargo, el medio de cultivo comercial mostró un porcentaje menor (34,8%) de embriones que los otros dos medios de cultivo ($p<0,05$; Fig. 5) con diferencia estadística.

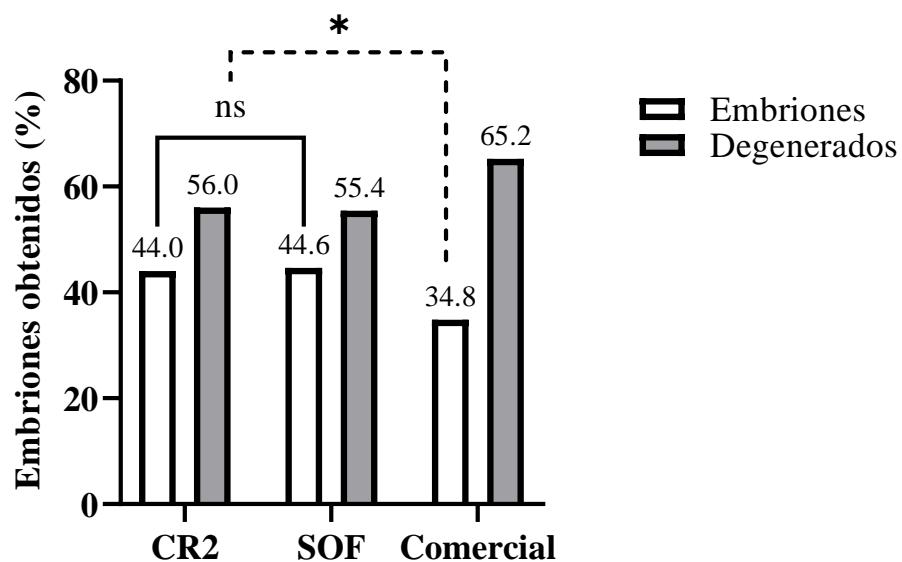


Figura 4. Porcentaje de embriones obtenidos al final de la producción de embriones *in vitro* en los tres tratamientos en estudio. Prueba de Chi cuadrado al 5%. * =diferencia entre tratamientos en producción de embriones *in vitro*.

Cuando se emplean de ovarios de matadero como fuente primaria para obtener los ovocitos, la población de este tipo de células puede resultar altamente heterogéneas, lo cual provoca alta variabilidad en la obtención final de los embriones, esto ha provocado que en los últimos años los resultados se hayan estancado alrededor del 40% al final del proceso de la PIVE (Dubeibe, 2016).

En el presente estudio se utilizó ovocito obtenidos de ovarios de matadero, que recibieron condiciones de maduración y fecundación *in vitro* similares, y solo para el cultivo fueron separados en los tres tratamientos, luego de los 7 días se observó que el medio comercial utilizado para el CIV como testigo fue 10% menos efectivo que los medios no comerciales

(CR2 y SOF) lo cual nos lleva a pensar que estos dos medios (no comerciales) cumplieron de mejor manera con los requerimientos de micro y macro elementos de los ovocitos para su desarrollo a tal punto que el porcentaje de los medios no comerciales son similares a los estándares internacionales (44 %), por lo tanto, se encuentran estandarizados para la producción de embriones bovinos.

5.3 Estadio de los embriones obtenidos en los diferentes tratamientos

Al realizar la valoración el estadio de los embriones se determinó mayor porcentaje de blastocistos expandidos en los dos medios no comerciales CR2 (39,4 %) y SOF (35,4 %) frente al comercial (35,2 %), con diferencia estadística entre estos ($p<0,05$). En el porcentaje de blastocistos y blastocistos protruidos no mostró diferencias entre tratamientos ($p>0,05$; Tabla 1).

Tabla 2. Porcentaje del estadio de los embriones obtenidos con un determinado medio de cultivo *in vitro*.

Medio de cultivo	Blastocisto	Blastocisto Expandido	Blastocisto Protruido	Degenerado
CR2%	35,3	39,4b	27,8	31, 1a
SOF%	26,5	35,4b	41,8	31, 4a
Comercial%	38,2	25, 2a	30,4	37,5b
Total (%)	100	100	100	100

ab=diferencia estadística prueba de Chi cuadrado al 5%.

Se ha descrito que la competencia del ovocito está relacionada con su desarrollo, en un corto periodo de tiempo y viene determinado por la capacidad del gameto para lograr su maduración, fertilización y el desarrollo hasta la etapa de blastocisto (Conti & Franciosi, 2018), fase de cultivo *in vitro* (CIV) dentro del proceso de la PIVE. Además, para que logren completar estas tres fases (MIV, FIV, CIV) los medios en cada una de ellas juegan un papel importante, es por ello que varios laboratorios han patentado medios comerciales para cada una de las fases de la producción de embriones *in vitro* y describen que mediante el uso de sus productos y el respectivo protocolo se llega a tener entre el 30 y 35% de embriones al final de la PIVE, donde predominan los blastocistos expandidos, seguidos de los protruidos (Lonergan et al., 2016). En el presente trabajo con los medios no comerciales se consiguió mayor porcentaje de blastocistos expandidos.

5.4 Calidad de los embriones obtenidos en los diferentes tratamientos

En relación a la calidad, la mayor parte de los embriones excelentes se obtuvieron en los medios no comerciales (43,6 % CR2 y 36,8 % SOF), del total solo el 19,7 % se produjeron en el medio de cultivo comercial.

La proporción de embriones con calidad buena fue muy similar entre los medios de cultivo empleados, 36,9 % SOF; 28 % CR2; y 34,2 % Comercial. Esto no ocurrió con el porcentaje de embriones con calificación de regular, donde dos tercios fueron obtenidos en el medio comercial y porcentajes más bajos en los medios no comerciales (SOF=25 %; 8,3 %=CR2). Finalmente, los embriones muertos se mostraron en proporciones similares en los tres tratamientos (Tabla 2).

Tabla 3: Porcentaje de la calidad de los embriones obtenidos con un determinado medio de cultivo *in vitro*.

Medio de cultivo	Excelente	Bueno	Regular	Muertos
CR2%	43,6b	28,8	8,3a	31,1a
SOF%	36,8b	36,9	25ab	31,4a
Comercial%	19,7a	34,2	66,7b	37,5b
Total (%)	100	100	100	100

ab=diferencia estadística prueba de Chi cuadrado al 5%.

El medio de cultivo SOF fue el que proporcionó mejores resultados y estos fueron similares a los obtenidos por Murillo (2018), quien menciona que el desarrollo embrionario en un medio de cultivo *in vitro* con base SOF, suplementado con albúmina y otros factores de crecimiento, como las citoquinas y otras sustancias con propiedades embriotróficas, brinda como resultado embriones que presentan una masa celular interna más compacta y un número total de células óptima.

Además, el medio SOF contiene piruvato y glucosa considerados las principales fuentes de energía para los ovocitos y los embriones. Sin embargo, a medida que el embrión se va desarrollando y se convierte en blastocisto, sus necesidades energéticas van cambiando y aumenta el requerimiento de consumo de glucosa y la producción de lactato, por lo cual en una investigación se determinó que los medios en la parte final de la PIVE deben tener niveles bajos de lactato, acción que permite un aumento del 10% del número de embriones obtenidos al final de la PIVE (Kobanawa, 2022).

Conclusiones

Los medios no comerciales como el CR2 y el SOF se vuelven una gran alternativa para evitar la compra de los medios comerciales ya que en el presente estudio se ha demostrado que estos medios proporcionan mejores porcentajes de embriones de un estadio avanzado de desarrollo (blastocisto expandido), una muy buena calidad (excelentes) al final de PIVE. Esto permite a los diferentes grupos de investigación y a todos los interesados en estas biotecnologías acceder a medios de preparación propia que presenten resultados similares a productos testados a nivel internacional.

Recomendaciones

- Continuar la exploración y desarrollo de alternativas eficientes para la producción de embriones bovinos *in vitro* a partir del empleo de medios de cultivo no comerciales.
- Realizar una investigación similar en otras especies de ganado bovino y ovino-caprino, para ver cómo se comportan los medios de cultivo no comerciales en estas especies.
- Optimizar aún más las prácticas en la producción de embriones bovinos y divulgar estos resultados en otras instituciones que realizan una labor similar.

Referencias

- Ahuja Aguirre, C. (2009). Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Trop.*, 27(3). https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692009000300007
- Alvarado U., J., Argudo G., D., Iñiguez G., U., Bueno L., P., Méndez A., M. S., Soria P., M., Perea G., F. P., & Galarza L., D. A. (2020). Análisis morfométrico y funcional de ovocitos bovinos obtenidos de ovarios de matadero y por aspiración folicular transvaginal en vacas criollas del altiplano ecuatoriano. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2), e17838. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17838>
- Arias, M., Vargas, T., Gallardo, V., Águila, L., & Felmer, R. (2022). Simple and efficient chemically defined *in vitro* maturation and embryo culture system for bovine embryos. *Animals*, 12(21), 3057. <https://doi.org/10.3390/ani12213057>
- Ayala Guanga, L., Samaniego Campoverde, J., Argudo Garzón, D., Perea Brugal, M., Perea Ganchou, F., Rodas Carpio, E., & Nieto Escandón, P. (2020). El intervalo de tiempo entre la estimulación ovárica con FSH/LH y la colecta afecta la cantidad, calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos recuperados de novillas criollas ecuatorianas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(1), e17571. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17571>
- Bo, G., & Mapletoft, R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*, 10(3), 344-348.
- Botigelli, R., Razza, E., Pioltine, E., & Nogueira, M. (2017). New approaches regarding the *in vitro* maturation of oocytes: Manipulating cyclic nucleotides and their partners in crime. *J. JBRA Assisted Reproduction*, 21(1), 35.
- Callesen, H., Bogh, I., & Greve, T. (2019). Embryo transfer and other assisted reproductive technologies. En *Veterinary reproduction and obstetrics* (10th ed., pp. 778-805). Elsevier. doi:10.1016/b978-0-7020-7233-8.00044-6

- Conti, M., & Franciosi, F. (2018). Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: Integrated nuclear and cytoplasmic events. *Human Reproduction Update*, 24(3), 245-266.
- Demetrio, D. G. B., Benedetti, E., Demetrio, C. G. B., Fonseca, J., Oliveira, M., Magalhaes, A., & Santos, R. M. dos. (2020). How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro (12 years of practical results at a California dairy farm). *Animal Reproduction*, 17(3), e20200053. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0053>
- Dubeibe, D. (2016). Del laboratorio al campo: Gestación bovina producto de fecundación in vitro. *Spei Domus*, 12(24). [https://doi.org/10.16925/sp.v12i24.1892](http://dx.doi.org/10.16925/sp.v12i24.1892)
- Enríquez Martínez, M. E. (2022). *Tasa de gestación en vacas receptoras holstein empleando embriones criopreservados estadio blastocito expandido en dos regiones semiáridas de México* [Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. <https://repositorio.uaaa.mx/handle/123456789/49117>
- Erdem, H., Karasahin, T., Alkan, H., Dursun, S., Satilmis, F., & Guler, M. (2020). Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), 2541-2547. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02287-6>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermilliod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermilliod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), Article 5. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

- Gamit, T., Hajoori, Dr. M., Assistant Professor, Bhagwan Mahavir college of Basic and Applied Sciences Bhagwan Mahavir University, Surat,Gujrat, India-395007, Maisuria, N., & Assistant Professor, Bhagwan Mahavir college of Basic and Applied Sciences Bhagwan Mahavir University, Surat,Gujrat, India-395007. (2023). A Review: Formulation of Alternative Culture Media. *International Journal of Life Science and Agriculture Research*, 02(08). <https://doi.org/10.55677/ijlsar/V02I08Y2023-01>
- Ghiasi, M. (2014). In vitro Maturation of Human Oocytes using Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells and Formation of Embryo by Use of ICSI. *SMU Medical Journal*, 1(1).
https://www.researchgate.net/publication/281318418_In_Vitro_Maturation_of_Human_Oocytes_using_Conditioned_Medium_of_Mesenchymal_Stem_Cells_and_Formatio_n_of_Embryo_by_Use_of_ICSI
- Gonella Diaz, Á. M., Atuesta Bustos, 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. <https://doi.org/10.22490/21456453.1967>
- Holm, P., Booth, P., Schmidt, M., Greve, T., & Callesen, H. (1999). *High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using Sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins*. 99. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4)
- Huanca Mamani, T. (2022). Efecto de factores embriotróficos a diferentes tensiones de oxígeno en cultivo in vitro sobre el desarrollo embrionario de alpacas hasta la etapa de blastocisto. *La Granja*, 36(2). <https://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.09>
- Jiménez, T. (2024). *Pasantía en reproducción asistida en ganado de leche en la empresa "Phönix Repro, GmbH", Brandenburg, Alemania* (p. 81) [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional.
- Kerns, K., Zigo, M., Drobnis, E., & Sutovsky, M. (2018). Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nature Communications*, 9, 2061.

- Kim, M., Hong, S. J., Lee, J. H., Min, C. K., Hwang, K. J., & Park, R. W. (2011a). Comparación de medios de maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros: La efectividad del medio de cultivo para blastocitos. *Fertility and Sterility*, 95(2), 1-4.
- Kim, M., Hong, S. J., Lee, J. H., Min, C. K., Hwang, K. J., & Park, R. W. (2011b). Comparison of *in vitro* maturation media of immature oocytes: The effectiveness of blastocyst culture media. *Fertility and Sterility*, 95(2), 554-557. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.10.035>
- Kobanawa, M. (2022). Fertilization, embryo culture, and clinical results using low lactate embryo culture medium for pre-culture, insemination, and beyond. *Reproductive Medicine and Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1002/rmb2.12458>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2014). The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, 81, 49-55.
- Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., & Rizos, D. (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86, 270-277.
- Luciano, A., & Sirard, M. (2018). Successful *in vitro* maturation of oocytes: A matter of follicular differentiation. *Biol Reprod*, 98(2), 162-169.
- Murillo, A. (2018). *Sistema de cultivo para mejorar la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro* (p. 264) [Tesis Doctoral]. Universidad Politécnica de Valencia.
- Noga, N., & Looney, C. (2021). Embryo transfer and embryo collection. En *Bovine reproduction* (1st ed., pp. 1041-1060). John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9781119602484.ch83
- Nowicki, A. (2021). Embryo transfer as an option to improve fertility in repeat breeder dairy cows. *J Vet Res*, 65(2), 231-237. <https://doi.org/doi: 10.2478/jvetres-2021-0018>
- Nuttinck, F., Jouneau, A., Charpigny, G., Hue, I., & Richard, C. (2017). Prosurvival effect of cumulus prostaglandin G/H synthase 2/prostaglandin2 signaling on bovine blastocyst: Impact on *in vivo* posthatching development. *Biol Reprod*, 96(3), 532-541.

- Palasz, A., & De la Fuente, J. (2008). Cultivo de embriones bovinos: Efecto de los medios de cultivo y de los requerimientos fisiológicos sobre la calidad de los embriones producidos in vitro. Parte (II). *CIS-B*, 9(5).
https://www.mendeley.com/catalogue/d3b4b033-d1a8-3522-bd83-8a1254078ef0/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.8&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7Ba82663d6-d2b4-4b8e-8e26-22a054100c7d%7D
- Parrish, J. J. (2014). Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67-73.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- Pontes, J. H. F., Melo Sterza, F. A., Basso, A. C., Ferreira, C. R., Sanches, B. V., Rubin, K. C. P., & Seneda, M. M. (2011). Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 75(9), 1640-1646.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>
- Quispe, C. E., Ancco G., E., Solano A., J., Unchupaico P., I., & Mellisho S., E. (2018). Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(4), 1114-1121. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418>
- Ríos, M. (2022). *Eficiencia en la transferencia de embriones frescos de la raza Nelore en la Hacienda Real Wood, Planeta Rica, Córdoba*. (p. 49) [Tesis de Grado]. Unilasallista Corporación Universitaria.
- Rosenkrans, C. F., Zeng, G. Q., McNamara, G. T., Schoff, P. K., & First, N. L. (1993). Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, 49(3), 459-462. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.3.459>
- Rosete Fernández, J. V., Álvarez Gallardo, H., Urbán Duarte, D., Fragoso Islas, A., Asprón Pelayo, M. A., Rios Utrera, A., Pérez Reynozo, S., & De La Torre Sánchez, J. F. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: Cinco décadas de

investigación en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12, 39-78.

<https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>

Salgado, E., & Lopera, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Rev Invest Vet Perú*, 31(3), e17138.

Sánchez Sánchez, B. M. (2014). *Comparación de dos medios de cultivo in vitro : CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano* [Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/9489a591-72eb-4a59-9a2cb137d5831263/content>

Sirard, M.-A. (2018). 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, 156(1), R1-R7. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0008>

Soto, Y. G., Casas, E., Betancourt, J., & Fernández, F. (2019). Desarrollo embrionario de bovino in vitro cocultivado con células oviductales y del cumulus oophorus. *Rev Salud Anim*, 41(1), Article 1. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2019000100004

Soto-Martínez, Y. G. (2019). Desarrollo embrionario de bovino in vitro cocultivado con células oviductales y del cumulus oophorus. *Rev Salud Anim*, 41(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2019000100004

Speckhart, S., Wooldridge, L., & Ealy, A. (2022). An updated protocol for in vitro bovine embryo production. *STAR Protoc.* Vol 4(1). *STAR Protocols*, 4(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9758491>

Stroebech, L. (2015). In vitro production of bovine embryos: Revisiting oocyte development and application of systems biology. *Anim. Reprod.*, 12(3). <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6032f7783717068b4610/pdf/animreprod-12-3-465.pdf>

Thomson, S., Homes, R., & Landes, P. (2021). Thomson s, Homes R, Landes P. 2021. Assessment and selection of the recipient cows' corpus luteum at the time of embryo transfer and its influence on conception rate. *Australian Veterinary Journal*. 99 (7): 288-

292. Disponible en: *Australian Veterinary Journal*, 99(7), 288-292.

<https://doi.org/doi:10.1111/avj.13068>

Turathum, B., Gao, E., & Chian, R. (2021). Turathum B, Gao E-M, Chian R-C. 2021. The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. *Cells*. Vol 10(9): 2292. Disponible en: <Https://doi.org/10.3390/cells10092292>. *Cells*, 10(9), 2292. <https://doi.org/10.3390/cells10092292>

Velásquez-Penagos, J., Gutiérrez-Parrado, S., & Barajas-Pardo, D. (2018a). Evaluación de diferentes medios de cultivo en la producción in vitro de embriones bovinos. *Ciencias Veterinarias*, 36(3), 32. <https://doi.org/10.15359/rcv.36-3.22>

Velásquez-Penagos, J., Gutiérrez-Parrado, S., & Barajas-Pardo, D. (2018b). Evaluación de diferentes medios de cultivo en la producción in vitro de embriones bovinos. *Ciencias Veterinarias*, 36(3), Article 3. <https://doi.org/10.15359/rcv.36-3.22>

Viana, J. (2022). 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 40(4). https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf

Vilchis Ramos, J. L. (2011). *Manual de aspiración folicular en bovinos* [Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. http://repositorio.aaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3172/2929_JUAN%20LUIS%20VILCHIS%20RAMOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Wiltbank, M., Baez, G., Garcia, A., Toledo, M., Monteiro, P., Melo, L., & Ochoa, J. (2016). Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 86, 239-253.

Younis, A. I., Brackett, B. G., & Fayer-Hosken, R. A. (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Research*, 23(2), 189-201. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120230206>

Anexos



Anexo A. Preparación de materiales para la recuperación de COC's



Anexo B. Lavado de ovarios



Anexo C. Aspiración folicular.



Anexo D. Preparación de materiales para MIV



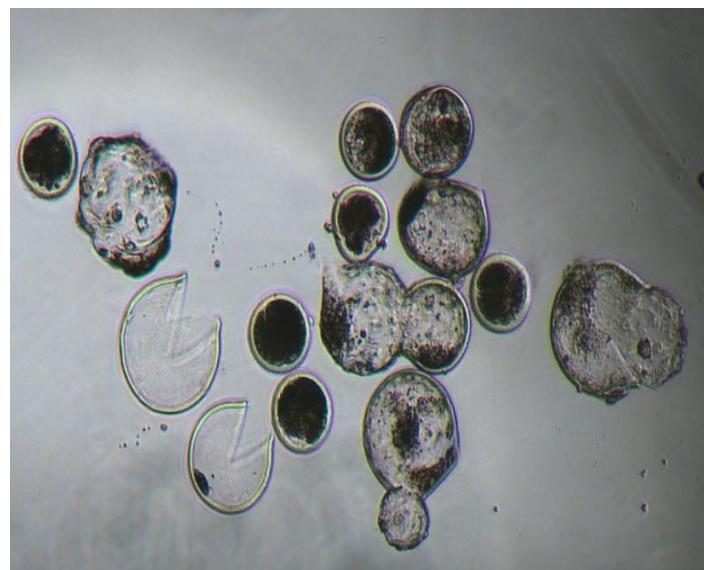
Anexo F. Lavado de ovocitos para Fecundación *in vitro*



Anexo G. Fecundación *in vitro* .



Anexo H. Cultivo *in vitro*



Anexo I. Embriones obtenidos en el proceso de PIVE.