

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TESIS DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TEMA:

**“EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE
EMBRIONES DE BOVINOS (*BOS TAURUS*) EN EL
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE
COTOPAXI”.**

AUTORES:

Miguel Angel Jácome Aymara
Mary Priscila Guamantario Tuba

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Cristian Arcos

Latacunga - Ecuador
2014

AVAL DE APROBACION

DIRECTOR DE TESIS

En calidad de Director de Tesis Titulada **“EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES DE BOVINOS (*BOS TAURUS*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**. Propuesto por los egresados Miguel Angel Jácome Aymara y Mary Priscila Guamantario Tuba, como requisito previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Atentamente,

Dr. Cristian Arcos

Director de Tesis

CARTA DE APROBACION

TRIBUNAL DE TESIS

En calidad de miembros del tribunal de grado aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi y CAREN por cuanto, los postulantes con el tema de tesis **“EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES DE BOVINOS (*BOS TAURUS*) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de defensa de tesis.

Por lo antes expuesto se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Dra. Jaine Labrada

Presidente del Tribunal.

Dra. Paola Lascano

Miembro del Tribunal.

Dra. Blanca Villavicencio

Opositora del Tribunal

AUTORIA

Nosotros, Miguel Angel Jácome Aymara y Mary Priscila Guamantario Tuba, declaramos que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de nuestra autoría y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido con la ley de propiedad intelectual, por su reglamentó y por la normativa institucional vigente.

Miguel Angel Jácome Aymara

C.I. 1723171367

AUTOR

Mary Priscila Guamantario Tuba

C.I. 1722077672

AUTOR

AGRADECIMIENTO

Después de un largo camino universitario me he dado cuenta que la vida está llena de personas que día a día brindan lo mejor de sí, con un solo objetivo ofrecernos sus virtudes para alcanzar una meta que hoy por hoy se ha cumplido con arduo pero satisfactorio trabajo, por ello quiero rendir mis más profundos agradecimientos a todos aquellos que siempre están apoyándome incondicionalmente.

Primeramente a DIOS, a la SANTÍSIMA VIRGEN DEL CISNE y a SAN CAYETANO, por la sabiduría y entendimiento que me han dado para poder llegar a culminar esta etapa de mi vida.

Con mucho cariño a mis padres Miguel Jácome y Verónica Aymara, que me dieron la vida y que han sido el pilar fundamental para alcanzar esta meta, que me han enseñado con su ejemplo desde pequeño a ser un hombre de bien con honestidad y perseverancia, gracias por creer en mí, por darme una carrera para mi futuro, de todo corazón dios les pague.

A todos mis familiares y amigos, porque de una u otra forma me ayudaron con su apoyo incondicional, a lo largo de mi formación académica, gracias por sus palabras de aliento y fe.

A mi director de tesis Dr. Cristian Arcos que me ha brindado su orientación y su paciencia, conjuntamente con la Dra. Paola Lascano, con todo su apoyo incondicional como verdaderos profesionales dedicando su tiempo para la realización de este trabajo.

A mis profesores de la Universidad Técnica de Cotopaxi que nos ayudaron de una u otra manera a formarnos como profesionales.

MIGUEL ANGEL

AGRADECIMIENTO

Una eterna gratitud a **DIOS**, por la vida, la salud y el amor que todos los días me ha brindado, por ser la senda de mi camino y porque me ha dado la fuerza para no desistir.

A mi familia, gracias por estar conmigo todos los días y por ser mi apoyo en todo momento.

A la **Universidad Técnica de Cotopaxi** por proporcionarme una formación de calidad, especialmente a los docentes de la Carrera de medicina veterinaria quienes me supieron inculcar toda su sabiduría, para así poder afrontar con dedicación y esfuerzo en todo lo que me proponga.

Un reconocimiento al **Dr. Cristian Arcos y la Dra. Paola Lascano**, quienes desde el inicio del trabajo investigativo supieron brindar sus valiosos conocimientos, orientado a los autores con su experiencia y observaciones.

MARY PRISCILA

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a mis padres quienes desde niño me enseñaron a confiar en Dios, a tener la tranquilidad de que todo va a estar bien, a pesar que hay que perder y ganar pequeñas batallas, para conseguir un sueño, por todo ese amor que les tengo, porque sé que este logro alcanzado no solamente es mío sino también de ellos quienes siempre serán mis únicos héroes.

MIGUEL ANGEL

“ Nunca desistas de un sueño. Sólo trata de ver las señales que te lleven a él. ”

Paulo Coelho

DEDICATORIA

A mi amada madre **Carmen Tuba** por su amor, esfuerzo, dedicación y sacrificio máspreciado que puede dejar a su hija “La educación”, por haberme enseñado con su ejemplo valores tan importantes como el respeto, la honradez y la humildad, y por haber sido apoyo en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis hermanos **Klever, Paula y Fernando** por su cariño apoyo para que sigamos adelante compartiendo juntos los buenos y malos momentos que la vida nos ha deparado.

A todas las personas que han permitido desarrollar mis conocimientos y con quienes he podido aprender y crecer.

MARY PRISCILA

“ La gran bendición de la vida es el mañana, y hacer realidad tus sueños. ”

Paulo Coelho

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, nos corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

Miguel Angel Jácome Aymara

Mary Priscila Guamantario Tuba

INDICE DE CONTENIDOS

AVAL DE APROBACION DIRECTOR DE TESIS	ii
CARTA DE APROBACION TRIBUNAL DE TESIS	iii
AUTORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vii
DECLARACION EXPRESA	ix
INDICE	x
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
AVAL DE TRADUCCION	ix
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
HIPOTESIS	2
CAPITULO I	3
1 MARCO REFERENCIAL	3
1.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor	3
1.1.1 Ovarios	4
1.1.1.1 Irrigación	5
1.1.1.2 Función endocrina	6
1.1.1.3 Función exocrina	6
1.1.2 Oviductos	6
1.1.2.1 Irrigación e inervación de los ovocitos	8
1.1.3 Útero	8
1.1.3.1 Irrigación e inervación del útero	9
1.1.4 Cérvix	9
1.1.5 Vagina	10
1.1.6 Genitales externos	11
1.1.6.1 Vestíbulo vaginal	11

1.1.6.2 Vulva	11
1.1.6.3 Clítoris	11
1.2 CICLO ESTRAL	12
1.3 OVOGENESIS	20
1.4 FOLICULOGENESIS	21
1.5 PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES	22
1.5.1 Reseña histórica	22
1.5.2 Sistema de producción in vitro	24
1.6 COLECCION DE OVOCITOS	24
1.7 CLASIFICACION DE OVOCITOS	25
1.8 MADURACION DE LOS OVOCITOS	27
1.9 FECUNDACION DE LOS OVOCITOS	28
1.10 CULTIVO EMBRIONARIO	29
1.11 COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	32
1.11.1 Parámetros biofísicos y elementos inorgánicos	32
1.11.2 Compuestos orgánicos	33
1.11.3 Fuentes de energía	33
1.11.4 Aminoácidos	35
1.11.5 Suplementación proteica	35
1.12 NUEVAS METODOLOGIAS DE CULTIVO	40
1.13 FUTUROS ESTUDIOS	42
1.13.1 Estudios genómicos	42
1.13.2 Estudios posgenomicos	44
1.14 CALIFICACION DE EMBRIONES EN VIVO	44
1.14.1 Clasificación según su estado celular	44
1.14.2 Calificación de acuerdo a su calidad	49
1.15 CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS	50
1.15.1 Descripción del proceso de criopreservacion de las soluciones acuosas	51
1.15.2 Congelación	51
1.15.3 Vitrificación	52
1.15.4 Congelación de embriones	53

1.15.4.1 Exposición de los embriones a las soluciones de congelación	53
1.15.4.2 Envasado de los embriones	54
1.15.4.2.1 Enfriamiento inicial	54
1.15.4.2.2 Inducción de la cristalización o "seeding"	54
1.15.4.2.3 Descenso térmico lento y controlado	55
1.15.4.2.4 Descenso térmico rápido	55
1.15.4.2.5 Almacenamiento en n ₂ líquido	55
1.15.4.2.6 Descongelación	55
1.15.4.3 Extracción de los crioprotectores	56
1.16 VITRIFICACION DE EMBRIONES	57
1.16.1 Exposición de los embriones a las soluciones de vitrificación	57
1.16.2 Envasado de los embriones en recipientes apropiados y en pequeños volúmenes	58
1.16.3 Descenso ultrarrápido de la temperatura (vitrificación)	58
1.16.4 Calentamiento rápido de los embriones hasta temperaturas fisiológica	59
1.16.5 Extracción de los crio protectores	59
1.17 SOBREVIDA EMBRIONARIA POSCRIOPRESERVACION EVALUADA IN VITRO	60
1.18 EFECTO DEL DESCENSO TERMICO SOBRE LAS ESTRUCTURAS CELULARES	61
1.18.1 Crioinjurias	61
1.18.2 Formación de hielo intra o extracelular	61
1.18.3 Aumento o disminución excesiva de volumen celular por efecto osmótico	62
1.18.4 Efecto toxico de los crio protectores	63
1.18.5 Alteraciones de las membranas celulares	63
1.18.6 Fractura embrionaria o de la zona pelucida	64
1.19 RESPUESTA CELULAR ANTE LAS CRIOINJURIAS	65
1.19.1 Cambios estructurales y ultra estructurales relacionados con la crio preservación	65
1.19.2 Cambios metabólicos asociados a la crio preservación	66

CAPITULO II	68
2. MATERIALES Y METODOS	68
2.1 Localización	68
2.1.1 Ubicación del ensayo	68
2.1.2 Condición geográfica	68
2.2 MATERIALES	69
2.2.1 Materiales de oficina	69
2.2.2. Materiales de campo	69
2.2.3. Recursos tecnológicos	69
2.2.4. Materiales de laboratorio	69
2.2.5. Materiales biológicos	70
2.3 DISEÑO METODOLOGICO	71
2.3.1 Tipo de investigación	71
2.3.2 Metodología no experimental	71
2.3.3 Unidades experimentales	71
2.3.4 Métodos y técnicas a ser empleadas	72
2.4 DESARROLLO DEL ENSAYO	75
2.4.1 Obtención y maduración de ovocitos in vitro	75
2.4.1.1 Acondicionamiento del material y aspiración de los ovocitos	75
2.4.1.2 Lavado y selección de los ovocitos	75
2.4.1.2.1 Procedimiento detallado	76
2.4.1.3 Maduración de ovocitos en microgotas	76
2.4.1.3.1 Procedimiento detallado	76
2.4.2 Fecundación in vitro de ovocitos	77
2.4.2.1 Procedimiento detallado	77
2.4.2.2 Acondicionamiento del semen por centrifugación en gradientes de percoll	78
2.4.2.3 Fecundación en microgotas	79
2.4.2.3.1 Procedimiento detallado	79
2.4.3 Cultivo in vitro de embriones	79
2.4.3.1 Eliminación del exceso de células del cumulus	79
2.4.3.1.1 Procedimiento detallado	80

2.4.3.2 Cultivo de embriones en microgotas	81
2.4.4 Congelación	81
2.4.4.1 Procedimiento detallado	81
2.4.5 Descongelación	82
2.4.5.1 Procedimiento detallado	82
2.4.6 Clasificación embrionaria	82
2.4.6.1 Estadio de desarrollo embrionario	82
2.4.6.2 Calidad embrionaria	83
CAPITULO III	84
3 ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	84
3.1 Número de ovocitos recolectados	84
3.2 Clasificación de ovocitos	84
3.3 Número de ovocitos maduros y atrésicos	85
3.4 Número de ovocitos fertilizados	86
3.5 Número de embriones producidos	87
3.6 Clasificación embrionaria	88
CONCLUSIONES	90
RECOMENDACIONES	91
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	92
ANEXOS	95
Anexo 1 – Glosario de términos	96
Anexo 2 - Medios utilizados para MIV, FIV y Cultivo de embriones	102
Anexo 3 - Obtención de ovarios	103
Anexo 4 - Aspiración de ovocitos	104
Anexo 5 - Selección de ovocitos aspirados	105
Anexo 6 - Lavado de ovocitos	107
Anexo 7 - Maduración de ovocitos	110
Anexo 8 - Capacitación espermática	111
Anexo 9 - Fertilización de ovocitos	113
Anexo 10 - Cultivo de embriones	115
Anexo 11 - Clasificación embrionaria	116
Anexo 12 - Crioconservacion de embriones	118

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista lateral, sistema reproductor femenino	3
Figura 2. Folículos sobre los ovarios	4
Figura 3. Corte transversal del ovario	5
Figura 4. Unión utero-tubal	7
Figura 5. Infundíbulo atrapa el huevo al caer del ovario	7
Figura 6. El útero se divide en dos cuernos uterinos	8
Figura 7. Transporte de los espermatozoides	9
Figura 8. Cérvix	10
Figura 9. Ciclo estral bovino	12
Figura 10. Interpretaciones hormonales	13
Figura 11. Folículo en crecimiento	14
Figura 12. Ovulación	15
Figura 13. Cuerpo lúteo	15
Figura 14. Progesterona inhibe la liberación de FSH y LH	16
Figura 15. Prostaglandina destruye al cuerpo lúteo	17
Figura 16. Crecimiento de folículos (FSH) y Producción de estrógeno (LH)	17
Figura 17. Ciclo estral dos fases	18
Figura 18 Ondas foliculares	19
Figura 19: Procesos de ovogénesis	20
Figura 20: Etapas del desarrollo folicular	22
Figura 21: Categorías de ovocitos	26
Figura 22: 1. Zona pelucida; 2. Masa celular; 3. Espacio perivitelino	45
Figura 23: mórula (estadio 4)	45
Figura 24: Blastocisto. Nótese la cavidad y el fluido	46
Figura 25: Adelgazamiento de la zona pelucida	46
Figura 26: (1). Mórula compacta; (2). Infertilizados; (3). Mórulas tempranas; (4). Infertilizado	47
Figura 27: Clasificación de acuerdo al número de células	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°1 Recolección de ovarios y ovocitos	84
Cuadro N°2 Categorías de ovocitos obtenidos	84
Cuadro N° 3 Ovocitos maduros y atrésicos	85
Cuadro N°4 Numero de ovocitos fecundados	86
Cuadro N°5 Número de embriones	87
Cuadro N°6 Estadio de desarrollo y grados de calidad	88

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico N° 1 Clasificación de ovocitos	85
Gráfico N° 2 Ovocitos maduros y atrésicos	86
Gráfico N° 3 Número de ovocitos fecundados	87
Gráfico N° 4 Embriones producidos	88
Gráfico N° 5 Estadio de desarrollo y grados de calidad	89

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con el objetivo principal del presente estudio, Evaluar la producción in vitro de embriones bovinos (*Bos Taurus*), por la técnica de aspiración folicular directa. Para el estudio se recolectaron doscientos veinte ovarios procedentes de centros de faenamiento, los cuales fueron colocados en un termo con un medio apropiado para su transporte al laboratorio; de ahí se realizó un lavado y se retiró el tejido anexo, posteriormente se procedió a la aspiración, lavado y clasificación de ovocitos. La producción in vitro de embriones bovinos se realizó en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son: Maduración de ovocitos, Fecundación de ovocitos maduros y Cultivo de embriones. Estos tres pasos, comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos, condicionando cada uno por ser el éxito o el fracaso del siguiente. Luego de la maduración in vitro, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar, alcanzaron la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24hs de comenzada la maduración. De estos, aproximadamente el 47.33% fue fecundado y comenzaron a dividirse, al menos, hasta la etapa de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanzaron la etapa de blastocisto o blastocisto expandido, luego del cultivo durante 6-7 días. Esto indica que el cultivo embrionario, corresponde al paso más prolongado dentro del proceso de producción in vitro en donde se establece el mayor porcentaje de pérdidas. A su vez, durante esta etapa, se define en gran medida la calidad y cantidad de los embriones obtenidos para su posterior utilización, sean estos para crioconservar o a su vez ser implantados en receptoras.

ABSTRACT

This research was conducted at the Laboratory of Reproductive Biotechnology Career in Veterinary Medicine, Cotopaxi Technical University, with the main objective of the present study; evaluate the in vitro production of bovine embryos (*Bos Taurus*), by the technique of direct follicular aspiration. Hence washing was performed and Annex tissue was removed, and then proceeded to aspiration, to study two hundred and twenty ovaries from centers of slaughter, which were placed in a flask with an appropriate means of transport to the laboratory were collected washing and classification of oocytes. The in vitro production of bovine embryos was performed in three main steps, which, regardless of the protocol used, in chronological order are: Oocyte maturation, fertilization of mature oocytes and embryos crops. These three steps comprise a complex series of physiological processes, many of which are still unknown, conditioning each as the success or failure of the next. After in vitro maturation, approximately 90% of the immature oocytes made cultivar reached metaphase II and will expel the first polar body between 16 and 24 hours of maturation commenced. Of these, approximately 47.33 % was fertilized and began to divide at least until the stage of 2 to 4 cells. However, only 25-40% reached the blastocyst stage or expanded blastocyst after culture for 6-7 days. This indicates that the embryo culture, it is the longest step in the process of in vitro production where the highest percentage of losses is established. In turn, during this stage, largely defines the quality and quantity of embryos for later use, whether to cryopreserve or turn implantation in recipients.

CAPITULO I

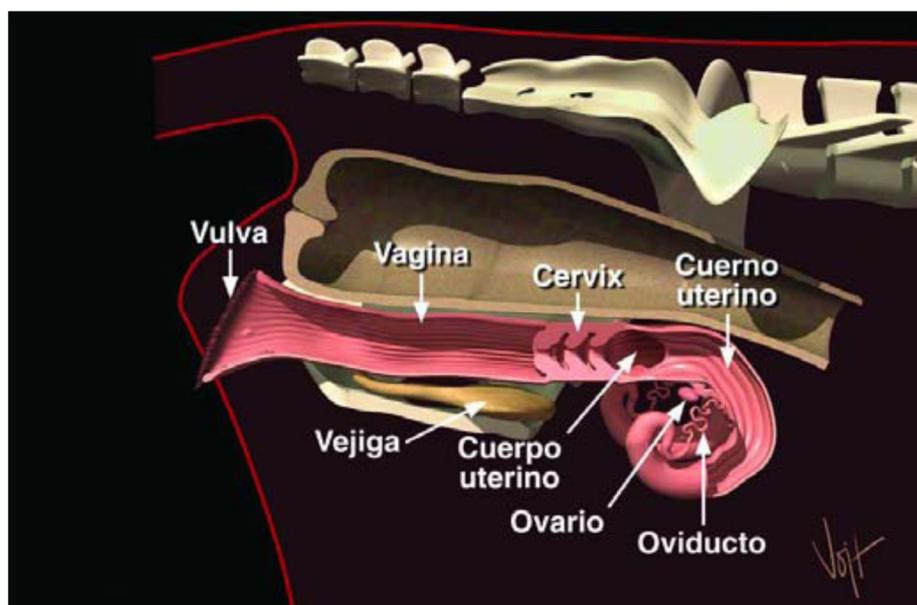
1. MARCO REFERENCIAL

1.1 ANATOMIA Y FISIOLOGIA DEL APARATO REPRODUCTOR

Los órganos que conforman el aparato reproductor femenino de los bovinos son ovarios, oviductos, un útero, cuello uterino o cervix, vagina y genitales externos. Los órganos internos están sostenidos por el ligamento ancho, consta de un mesovarico que sostiene el ovario; mesosalpinx que sostiene a los oviductos, y mesometrio que sostiene al útero. Los ovarios, oviductos y útero están inervados primariamente por nervios autónomos. El nervio pudendo aporta las fibras sensoriales y parasimpáticas de la vagina, vulva y clítoris.

La vejiga está ubicada debajo del aparato reproductor, y está conectada a la apertura uretral en la base de la vagina. El recto está ubicado encima del aparato reproductor (Nebel, 2005). (Figura 1).

Figura 1. Vista lateral, sistema reproductor femenino.



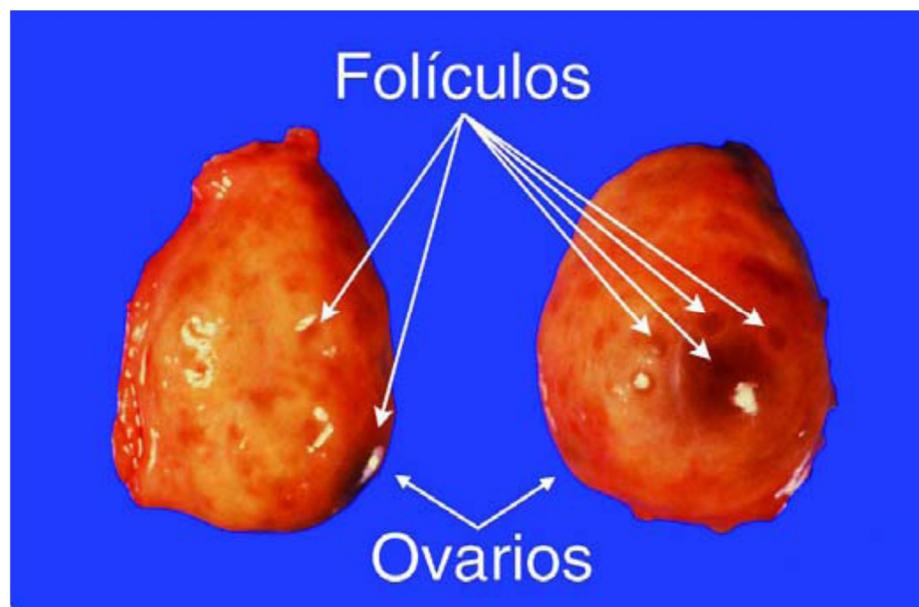
Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

1.1.1 OVARIOS

Los ovarios son los órganos principales del aparato reproductor femenino. Tienen dos funciones: la producción de óvulos y la producción de hormonas, principalmente estrógenos y progesterona, durante los distintos estadios del ciclo estral. Por lo regular el ovario derecho es mayor que el izquierdo. En la superficie del ovario se pueden encontrar dos estructuras diferentes: folículos y cuerpo lúteo (Nebel, 2005).

Los folículos son estructuras llenos de fluidos, que contienen los óvulos en desarrollo (Figura 2). Usualmente se pueden encontrar varios folículos en cada ovario, que varían en tamaño desde apenas visibles, hasta 20 mm en diámetro. El folículo más grande sobre el ovario es considerado "el dominante", y es el que probablemente ovule cuando el animal entre en celo (Meldejarnette, 2005).

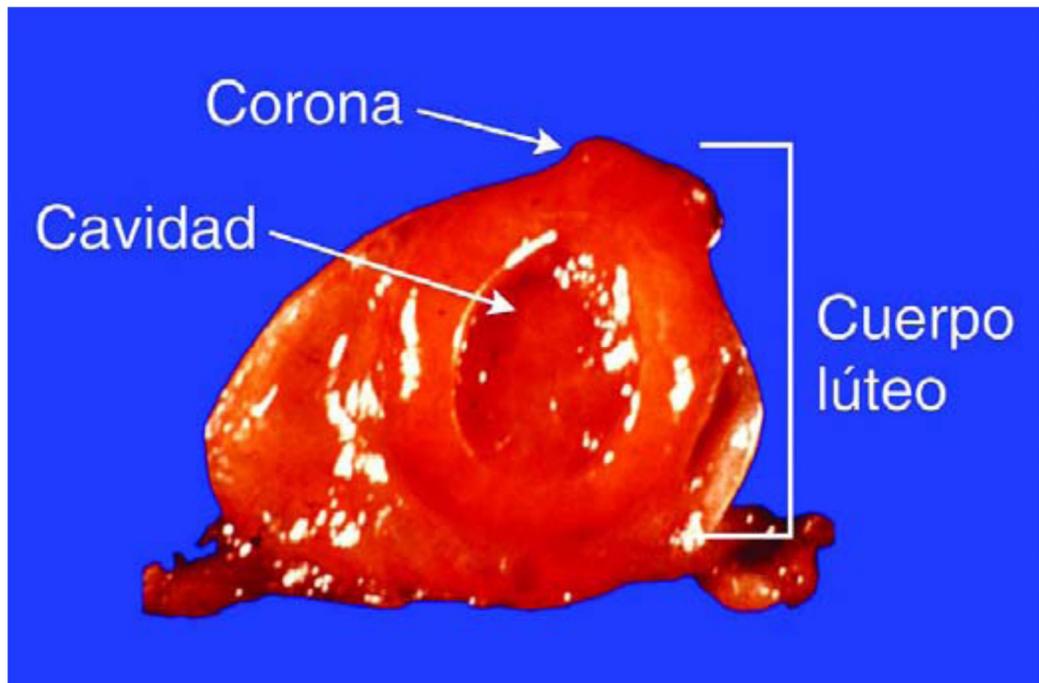
Figura 2. Folículos sobre los Ovarios.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

La otra estructura que se encuentra en la superficie del ovario es el Cuerpo Lúteo (CL). El CL crece sobre el sitio de la ovulación del celo anterior (Nebel, 2005). (Figura 3).

Figura 3. Corte transversal del Ovario con Cuerpo Lúteo.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

A menos que haya habido más de una ovulación, se debe hallar solo un CL en uno de los ovarios. El CL normalmente tendrá una corona sobre su estructura, lo cual facilita su identificación durante la palpación rectal. El CL también puede tener una cavidad llena de fluidos, pero una pared más gruesa, por lo tanto tendrá una textura más tosca al tacto. El CL en latín significa "cuerpo amarillo." Aunque en su superficie, esta estructura tiene apariencia oscura, un corte transversal revela un amarillo rojizo en su interior (MelDeJarnette, 2005).

1.1.1.1 IRRIGACION

Los ovarios son irrigados por las arterias ováricas, las venas son abundantes y forman plexos. Los vasos linfáticos que efluyen a los ganglios lumbares. Por nervios son procedentes de los plexos renales y aórticos del simpático.

1.1.1.2 FUNCION ENDOCRINA

A partir de la pubertad el ovario elabora hormonas como estrógenos, progesterona, relaxina, inhibina para la hormona foliculo estimulante (FSH), activina para la hormona luteinizante (LH) y oxitocina. Las hormonas gonadotropas están relacionadas con el ciclo ovárico, a partir de la pubertad estas hormonas regulan el ciclo ovárico.

Las hormonas gonadotropas son elaboradas por la adenohipófisis bajo la influencia de las neurosecreciones del Hipotálamo, ellas son la FSH, LH y la LTH o luteotrófica. La FSH activa las células de la teca interna y de la capa granulosa en la producción de estrógenos, esto determina la maduración y desarrollo del foliculo. La LH actúa en la fase final de la maduración del foliculo e induce la ruptura del foliculo.

La LTH o prolactina, la cual desarrolla y regula la actividad del cuerpo amarillo en la producción de progesterona.

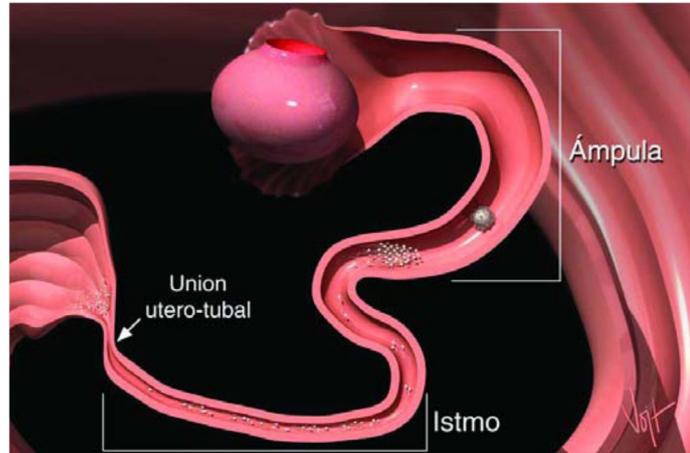
1.1.1.3 FUNCION EXOCRINA

En la formación y emisión del ovocito. Por lo tanto los ovarios son formadores de óvulos y hormonas. También se encuentra en constante movimiento interno.

1.1.2 OVIDUCTOS

Los oviductos son también conocidos como trompas de falopio. La porción más baja, la más cercana al útero, es llamada Istmo. La conexión entre el útero y el Istmo, es llamada Unión Utero-Tubal (UUT). La Unión Utero-Tubal sirve como filtro de espermatozoides anormales y es el reservorio de espermias hábiles (MelDeJarnette, 2005) (Figura 4).

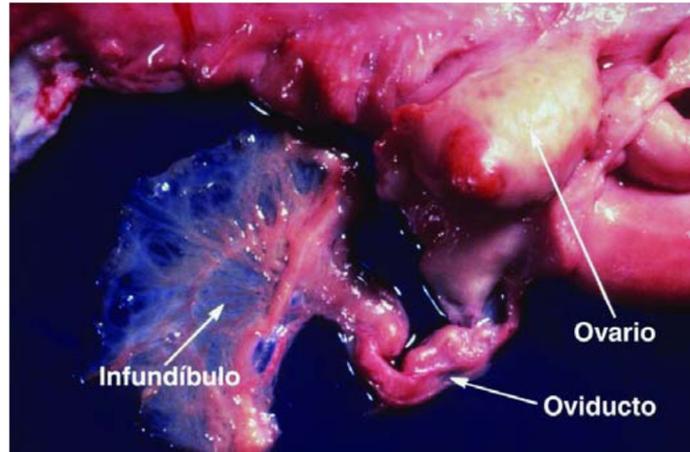
Figura 4. La unión Utero-Tubal, el Istmo y el ámpula son regiones del Oviducto con funciones distintas.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

La porción más alta del oviducto, cercana al ovario, es llamada ámpula. El diámetro interno del ámpula, adecuando al paso del ovulo, es mayor que el del istmo. Es en este segmento del oviducto donde ocurre la fertilización. La estructura en forma de embudo al final del oviducto, llamado infundíbulo, rodea los ovarios y cosecha los huevos, evitando que éstos caigan a la cavidad abdominal (Nebel, 2005).(Figura 5).

Figura 5. El Infundíbulo atrapa el huevo al caer del Ovario y lo conduce al Oviducto.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

1.1.2.1 IRRIGACION E INERVACION DE LOS OVOCITOS

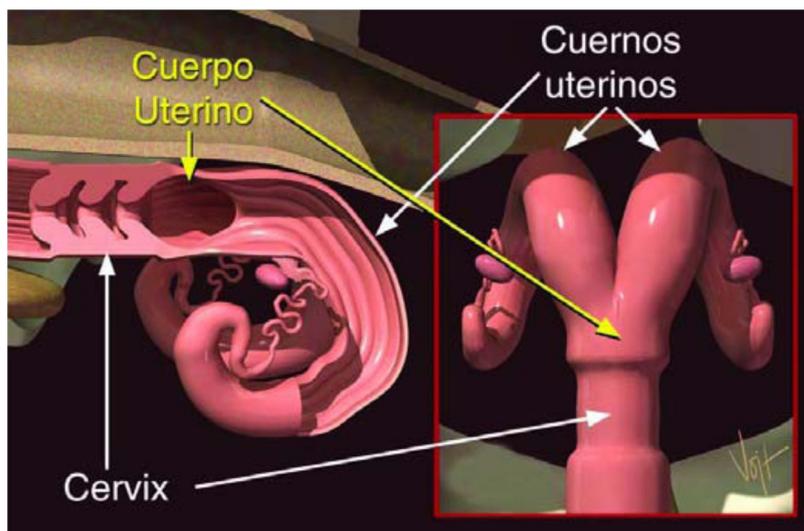
Es irrigado por la arteria útero-ovárica. Los vasos forman plexos vasculares subepiteliales y proliferan durante la gestación; mientras que los vasos linfáticos forman redes a nivel de la lámina propia de la mucosa y serosa drenando los ganglios linfáticos lumbares.

1.1.3 UTERO

Consta de dos cuerpos uterinos, un cuerpo y un cervix. Su estructura histológica y anatómica proporciona las condiciones propicias para la anidación y el desarrollo fetal hasta su nacimiento. (Figura 6).

Los dos cuernos uterinos están formados por tres capas musculares y una intrincada red de vasos sanguíneos. La función principal del útero es proveer el ambiente óptimo para el desarrollo fetal (Nebel, 2005).

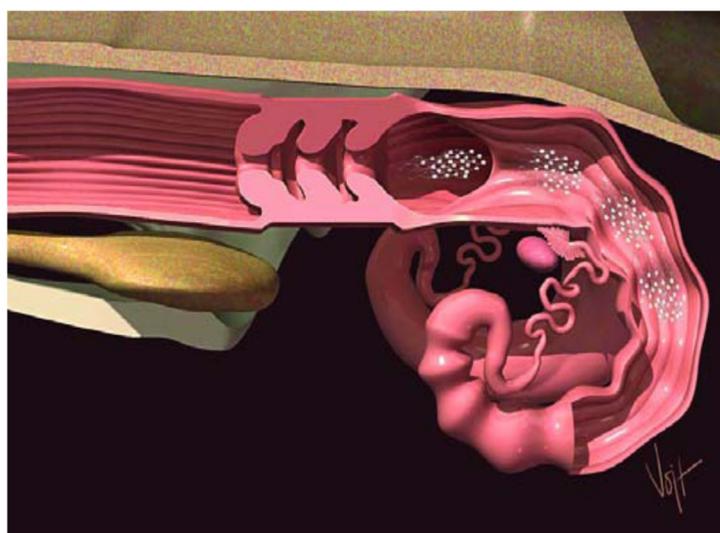
Figura 6. El útero se divide en dos Cuernos Uterinos.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

Cuando la hembra es servida, ya sea por monta natural o por inseminación artificial, los músculos uterinos, bajo la influencia de las hormonas estrógeno y oxitocina, se contraen rítmicamente para ayudar en el transporte de espermatozoides hacia el oviducto (Meldejarnette, 2005).(Figura 7).

Figura 7. Las contracciones uterinas ayudan en el transporte de los espermatozoides.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

1.1.3.1 IRRIGACION E INERVACION DEL UTERO

El principal aporte arterial corresponde a la arteria uterina y útero-ovárica. Las arterias son tortuosas y de paredes gruesas. Penetran el útero desde el ligamento ancho y forman una capa vascular de grandes vasos dispuestos circularmente entre las capas musculares circulares y longitudinales. Los vasos linfáticos forman una red subserosa y drenan en los ganglios linfáticos ilíaco interno y lumbar.

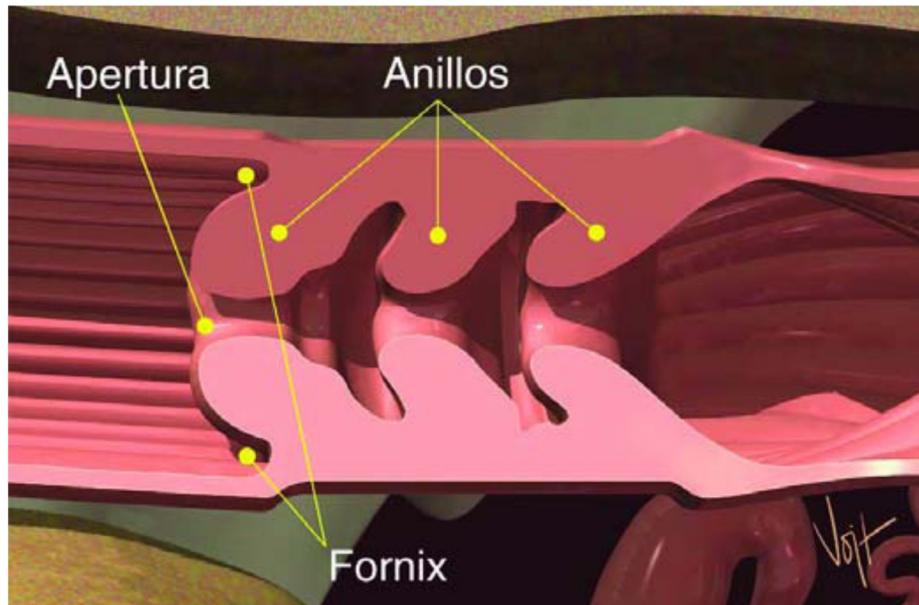
Los nervios derivan del sistema simpático a través de los plexos uterino y pélvico. La inervación parasimpática es a partir de los segmentos sacros que llegan al útero a través del plexo pélvico.

1.1.4 CERVIX

El cérvix es la porción caudal estrecha, que se une con la vagina. Posee una longitud de 10cm (Figura 8), con paredes gruesas con una luz muy estrecha denominada canal del cérvix, la cual se mantiene taponada mediante una secreción mucosa la cual evita que partículas extrañas provenientes de la vagina ingresen a la cavidad uterina. En dos ocasiones el canal cervical se abre durante el periodo de celo y el acto del parto. Por vía rectal es palpable el cérvix identificable por su pared regida.

Posee cuatro pliegues en forma de anillo, que le dan un aspecto de esfínter, junto con el tapón hace que el canal sea impenetrable.

Figura 8. El Cérvix



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

1.1.5 VAGINA

La vagina es el órgano de copulación que se extiende desde el orificio externo del útero hasta la desembocadura de la uretra, recibe el semen y es vía final del parto.

Se extiende desde la abertura externa del cervix hasta el meato uretral externo: en estado pasivo está colapsada. Su longitud es de 20- 30cm. se relaciona con el recto y la vejiga. La última porción, la más caudal, es retroperitoneal, al igual que la última porción del recto. (Castro, 1999)

1.1.6 GENITALES EXTERNOS

Vestíbulo vaginal, vulva (labios mayores, labios menores) y clítoris constituyen los genitales externos.

1.1.6.1 VESTIBULO VAGINAL

La separación entre la vagina y el vestíbulo está marcada por el orificio uretral externo y con frecuencia por un borde rudimentario del himen. En algunas

ocasiones el himen es tan prominente que interfiere en el proceso de la copula. Se extiende 10cm hacia adentro en donde se abre el orificio uretral externo en su superficie ventral.

1.1.6.2 VULVA

Es la apertura externa del aparato reproductor. Ella tiene tres funciones principales: dejar pasar la orina, abrirse para permitir la cópula y sirve como parte del canal de parto. (Meldejarnette, 2005).

Incluidos en la estructura vulvar están los labios. Los labios de la vulva están ubicados a los lados de la apertura vulvar, y tienen aspecto seco y arrugado cuando la vaca no está en celo. En la medida que el animal se acerque al celo, la vulva empezará a hincharse y tomará una apariencia rojiza y húmeda (Meldejarnette, 2005). La superficie contiene numerosas glándulas sebáceas grandes.

1.1.6.3 CLITORIS

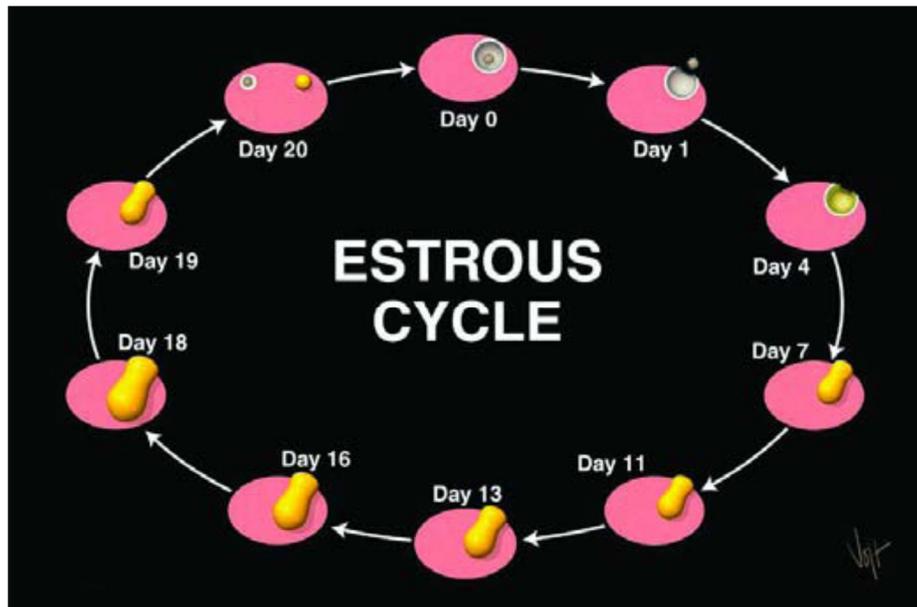
El clítoris se encuentra en la comisura ventral de la vulva. Órgano homólogo al pene masculino, está constituido por las mismas estructuras del pene (tejido eréctil) cubierto por un epitelio escamoso estratificado y terminaciones nerviosas abundantes. El clítoris se encuentra enterrado en la mucosa del vestíbulo.

1.2 CICLO ESTRAL

Los periodos sexuales, que presentan una sintomatología uniforme, se conocen como ciclos sexuales o ciclos estrales. (Grunert y Berchtold, 1988)

Con el tiempo, ocurren muchos cambios en el aparato reproductor, en respuesta a distintos niveles de hormonas. En una hembra no gestante, estos cambios ocurren cada 18 a 21 días. (MelDeJarnette, 2005).(Figura 9).

Figura 9. El Ciclo Estral bovino.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

Manifestación de los cambios cíclicos. En dependencia con las modificaciones cíclicas que se observa en el animal, el ciclo se divide para su mejor comprensión, en:

- Ciclo externo (cambios cíclicos en el comportamiento, así como en el animal, comprobables por examen externo).
- Ciclo ovárico (modificaciones cíclicas en los ovarios) (Grunert y Berchtold, 1988).

El ciclo estral este regulado por una interacción hormonal controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero (Figura 10).

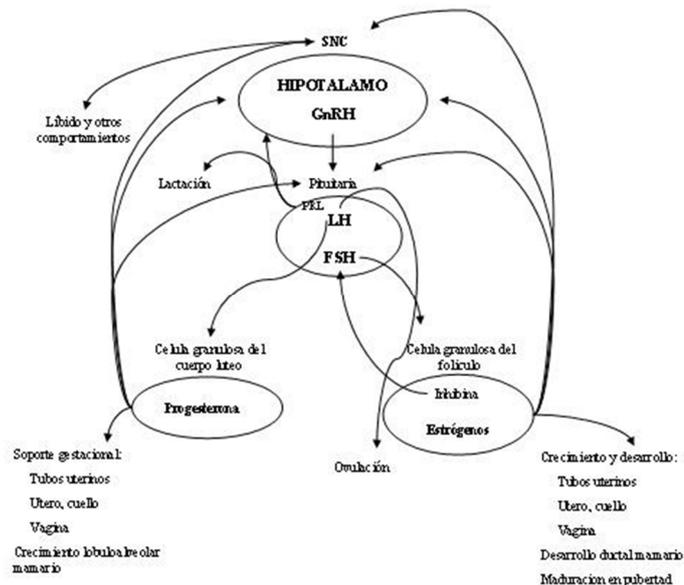
Hipotálamo produce la hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH, la cual es liberada en forma pulsátil a los capilares del sistema porta hipofisiario y de ahí a las células adenohipófisis para su posterior reacción. (Palma, 2001)

Hipófisis es una glándula compuesta por dos porciones bien diferenciadas, la adenohipófisis y la neurohipófisis (Hafez, 1990).

La **Adenohipófisis** produce varios tipos de hormonas, de las cuales la hormona foliculo estimulante FSH y la luteinizante LH, cumplen con el control neuroendocrino del ciclo estral, las cuales tienen su acción por medio de la membrana celular.

La FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular. La LH interviene en el proceso de esteroidogénesis ovárica, ovulación, formación del cuerpo lúteo y mantenimiento del mismo. (Hafez, 1990) Tanto la FSH y LH son secretadas a la circulación en forma de impulsos (Schallemberger y col, 1985), reguladas por la GnRH.

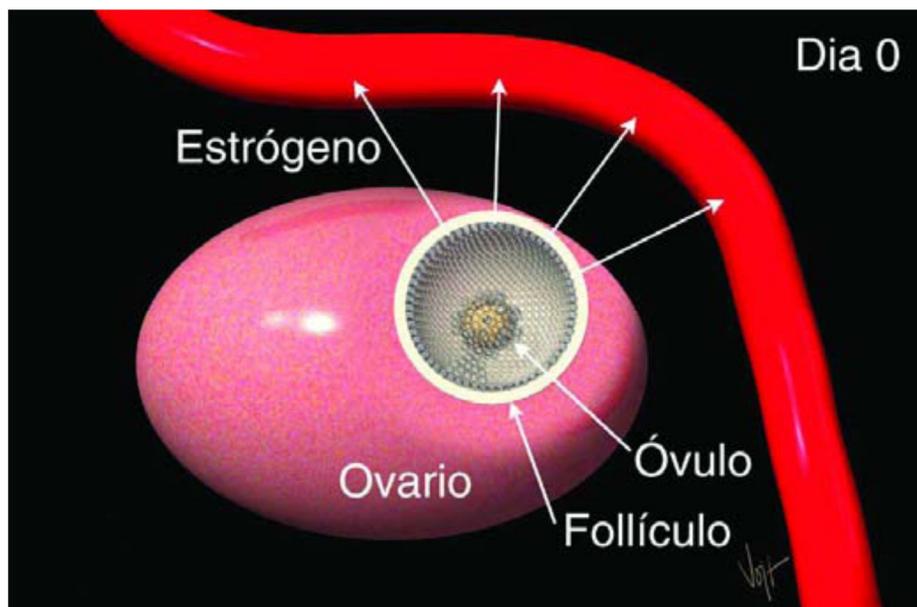
Figura 10: Interpretaciones hormonales.



Fuente: (Velazquez, 2008)

Empezando con una vaca en celo al día cero. Si miramos al aparato reproductor, vemos que están sucediendo varias cosas. Un ovario tendrá un folículo grande, tal vez de 15 a 20 mm de diámetro. Este folículo contiene un ovulo maduro, listo para ovular. Las células dentro del folículo están produciendo la hormona estrógeno (Nebel, 2005). (Figura 11).

Figura 11. El Estrógeno del folículo en crecimiento es transportado a todo el cuerpo en la corriente sanguínea.



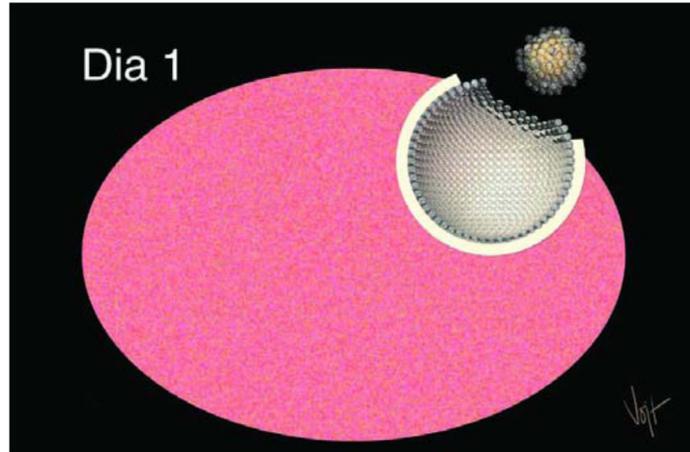
Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

Los esteroides ováricos se difunden desde la sangre hasta las células blanco y se unen con receptores específicos de alta afinidad en el citoplasma. (Hafez, 1990), causando que otros órganos reaccionen de distintas maneras y haciendo que el útero sea más sensible a estímulos, y ayuda en el transporte de espermatozoides.

Hace que la cervix secrete un moco viscoso que fluye y lubrica la vagina. El estrógeno también es responsable de los síntomas externos del celo, incluyendo una vulva rojiza y ligeramente inflamada, permitiendo que otras vacas la monten, dejen de comer, mugir frecuentemente y mantener erectas las orejas. Estos son solo unos cuantos de los muchos síntomas externos del celo (MelDeJarnette, 2005).

En el día 1 el folículo se rompe u ovula, permitiendo la salida del óvulo al infundíbulo que lo espera (Figura 12). La producción de estrógenos cesa varias horas antes de la ovulación, causando que la vaca no muestre más síntomas de celo. Después de la ovulación, un nuevo tipo de células, llamadas células lutéicas, crecen en el sitio donde estuvo el folículo.

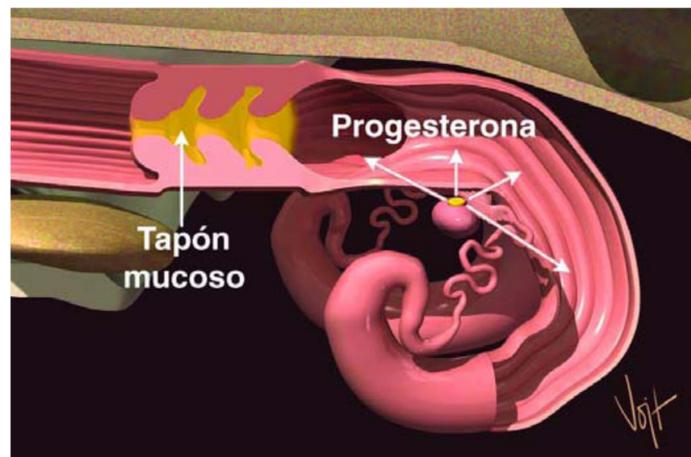
Figura 12. En el sitio de la ovulación crecen células Lutéicas.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

Durante los próximos cinco o seis días, estas células crecen rápidamente para formar el Cuerpo Lúteo (CL). El Cuerpo Lúteo produce otra hormona, la progesterona. La progesterona prepara al útero para la gestación. (Nebel, 2005) (Figura 13).

Figura 13. La Progesterona del Cuerpo Lúteo prepara el útero para la gestación.

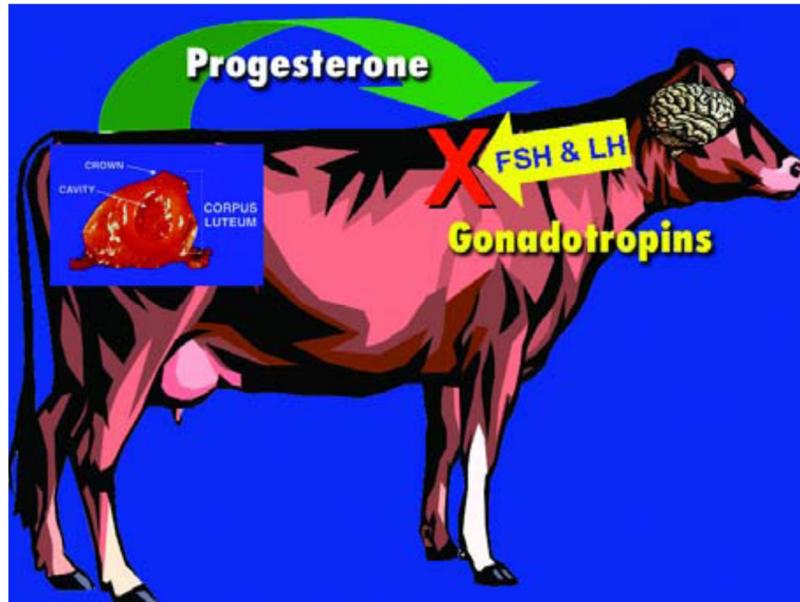


Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

Bajo la influencia de la progesterona, el útero produce una sustancia nutritiva para el embrión llamada leche uterina. Al mismo tiempo, la progesterona causa que se forme un tapón mucoso en la cervix, el cual evita que entren bacterias o virus al útero.

La progesterona también evita que el animal vuelva al celo al inhibir la liberación de gonadotropinas de la glándula pituitaria en el cerebro (Buxade, 1994) (Figura 14).

Figura 14. La Progesterona inhibe la liberación de FSH y LH.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

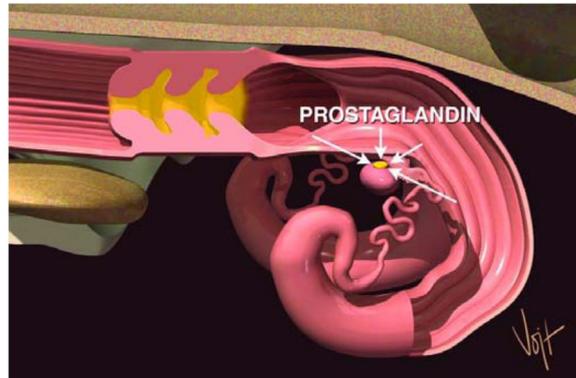
Existen dos gonadotropinas que la glándula pituitaria produce, almacena y libera. La primera es la hormona folículo estimulante (FSH). Tal como su nombre lo indica, esta hormona estimula el rápido crecimiento de folículos pequeños.

La hormona luteinizante (LH) es la segunda hormona gonadotrópica. Además de ayudar a la producción de progesterona por el CL, la LH también puede estimular la producción de estrógeno por los folículos grandes. Altos niveles de estrógeno pueden traer al animal de regreso al celo, y complicar la vida del embrión si esta vaca estuviera gestante.

Por lo tanto, la regulación que ejerce la progesterona sobre la producción de FSH y LH es un aspecto crítico sobre el mantenimiento de la preñez por otra parte, si el animal no había sido inseminada es deseable que vuelva al celo. Los días 16 a 18 del ciclo estral se conocen como " el periodo de reconocimiento materno,"

Durante este periodo, el útero busca la presencia de un embrión en crecimiento. Si no se detectara un embrión, el útero inicia la producción de otra hormona, la prostaglandina. Esta hormona destruye el cuerpo lúteo (Kolb, 1979) (Figura 15).

Figura 15. La Prostaglandina destruye al Cuerpo Lúteo.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

Cuando se destruye el CL, cesa la producción de progesterona y la glándula pituitaria empieza a aumentar la secreción de gonadotropinas. Altos niveles de LH estimulan al folículo dominante a producir estrógeno y traer al animal de regreso al celo (MelDeJarnette, 2005). (Figura 16).

Figura 16. Crecimiento de folículos (FSH) y producción de estrógeno (LH)



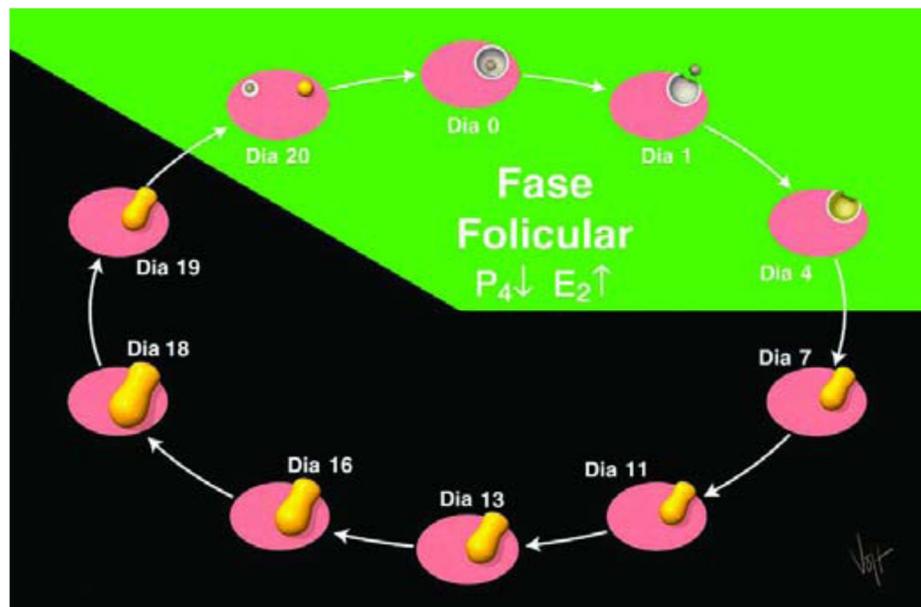
Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

Con esto se completa un ciclo estral. La periodicidad promedio es de 21 días. El ciclo estral es subdividido en dos fases, dependiendo de la hormona dominante, o en la estructura ovárica presente en cada fase. La fase lútica empieza con la

formación del CL, 5 o 6 días después del celo, y termina cuando esta entra en regresión a los 17 o 19 días del ciclo.

Durante esta fase, los niveles de progesterona son altos y los de estrógeno son bajos (Nebel, 2005). La otra fase es la folicular. Esta fase inicia cuando el CL de un ciclo entra en regresión y termina cuando se forma el CL del ciclo siguiente. Por lo tanto, la fase folicular abarca el período de la presentación de celo (MelDeJarnette, 2005). (Figura 17).

Figura 17. El Ciclo Estral se divide en dos fases.

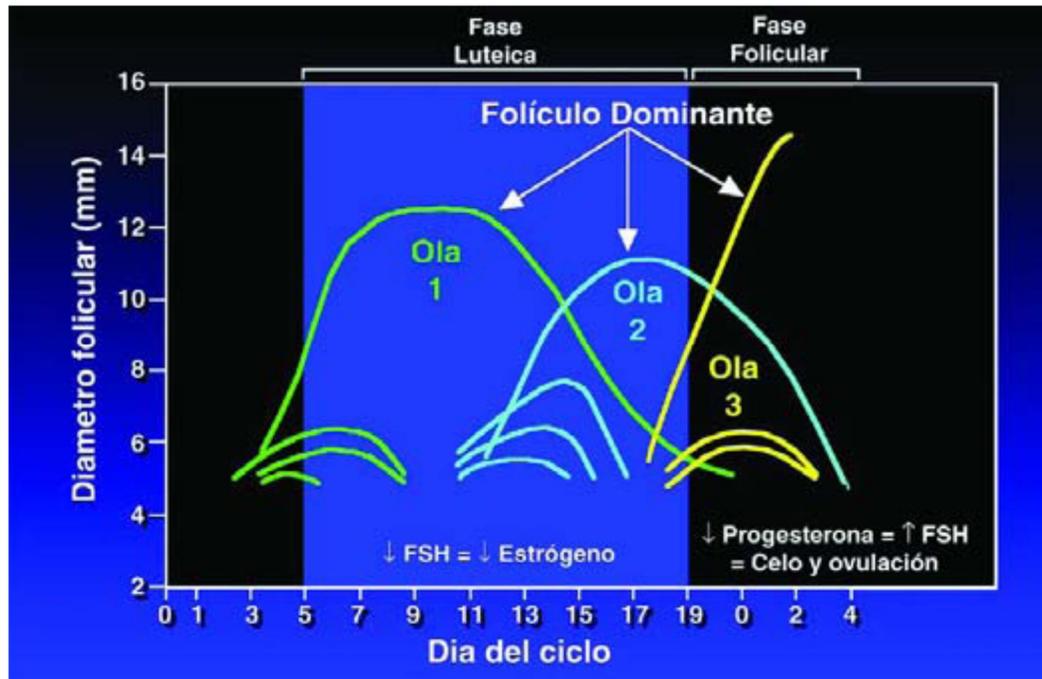


Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

Durante esta fase los niveles de estrógeno son altos y los de progesterona son bajos.

Tal como hemos mencionado anteriormente, pueden haber folículos en los ovarios en cualquier momento del ciclo estral. Usando tecnología de ultrasonido, las investigaciones han detectado que la aparición de folículos sobre los ovarios ocurre en "olas." en un ciclo estral normal de 21 días, un animal puede experimentar 2 o 3 olas de crecimiento folicular (Nebel, 2005) (Figura 18).

Figura 18. Ondas foliculares.



Fuente: (Nebel y MelDeJarnette, 2005).

El inicio de cada ola se caracteriza por un pequeño incremento de FSH, seguido por el rápido crecimiento de varios folículos. De esta ola folicular, un folículo es escogido para crecer más que los otros. Este folículo "dominante" tiene la habilidad de restringir el crecimiento de todos los otros folículos en los ovarios. Los folículos dominantes solo duran de 3 a 6 días, que es cuando mueren y entran en regresión u ovulan. En consecuencia, la desaparición del folículo dominante coincide con la formación de la siguiente ola, del cual saldrá otro folículo dominante.

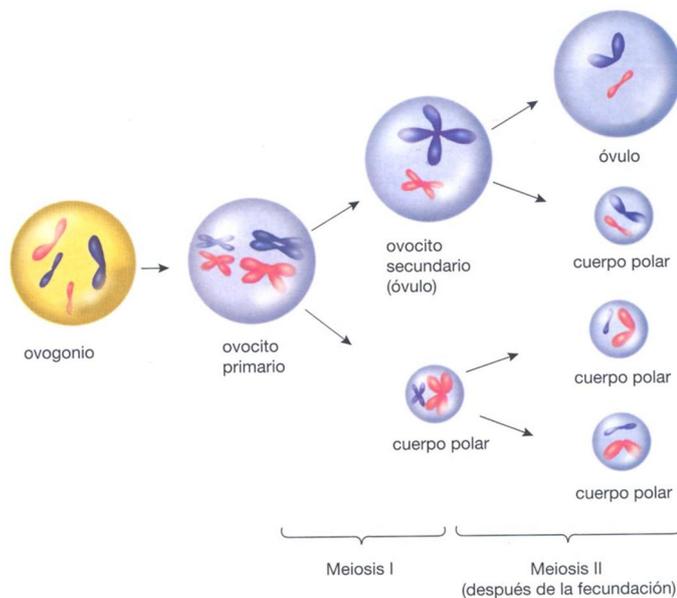
Aunque sea normal tener crecimiento folicular durante todo el ciclo estral, los bajos niveles de LH durante la fase lútea, evitan que estos folículos produzcan altos niveles de estrógeno, lo cual traería al animal de regreso al celo. Solamente el folículo dominante presente al momento de la regresión del CL, cuando los niveles de progesterona son bajos, puede producir suficiente estrógeno para traer al animal al celo y continuar hasta la ovulación. (Hernandez, 1994).

1.3 OVOGENESIS

La ovogénesis comienza en la vida fetal con la división mitótica de las ovogonias. En determinado momento, estas células se transforman en ovocitos y comienza el proceso de meiosis, el cual permite obtener una célula haploide capaz de ser fecundada (ovulo) (Palma, 2001).

Luego de comenzada la meiosis, los ovocitos son rodeados por células foliculares (células pregranulosas), y se produce la detención de la misma en el estado de diploteno, profase I, ovocito I, denominado estado dictiático. Cuando se produce el pico preovulatorio de LH, solo el ovocito contiene en el folículo preovulatorio reinicia su meiosis hasta el estadio de metafase II, ovocito II, estadio en cual ovula y permanece así, hasta que se contacte con el espermatozoide, en el momento de la fecundación y se transforma en el óvulo (Palma, 2001). Se debe tener en cuenta que al momento del nacimiento, todas las hembras mamíferas con una gran reserva de ovocitos los cuales declinan rápidamente a medida que se llega a la pubertad. No se conoce si este mecanismo representa una eliminación de ovocitos defectuosos que afectarían la eficiencia reproductiva (Palma, 2001).(figura 19).

Figura 19: Procesos de ovogénesis



Fuente: (Audesirk, 2003)

1.4 FOLICULOGENESIS

La foliculogénesis permite obtener un folículo preovulatorio o de Graff a partir de folículos primordiales. Este proceso comienza en la vida fetal, en la cual se constituye la reserva de folículos primordiales; y en la vaca se necesitan meses para que un folículo primordial se transforme en un folículo de Graff (Palma, 2001).

Folículo primordial se encuentra formado por el ovocito rodeado de una capa de células foliculares planas y por mecanismos intraovaricos, empiezan a crecer y entran en el pool de folículos en crecimiento. Los signos más precoces que indican que comenzó el crecimiento en este tipo de folículos son: 1) un incremento en el tamaño del ovocito, 2) un cambio en la forma de las células granulosas, pasan de planas a cúbicas y 3) se comienza a formar la zona pelúcida (Baker, 1982), denominándose a esta estructura folículo primario.

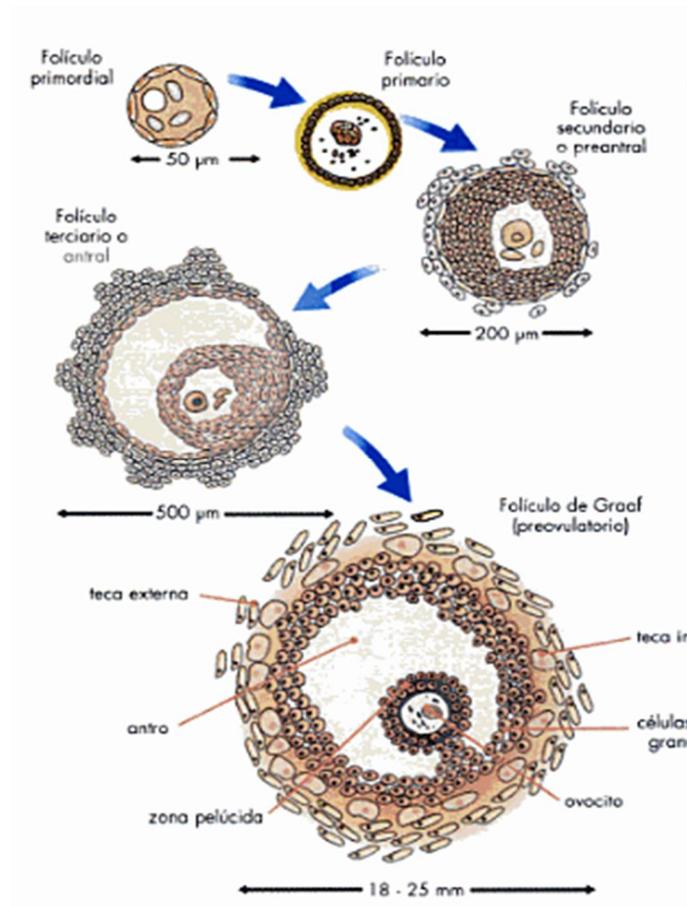
Posteriormente las células cúbicas se multiplican y aparecen 2 y más capas de la misma. En este momento una red de capilares invade la trama fibrosa ubicada entre las células que rodean al folículo y constituyen la capa vascular teca interna, la cual aporta los nutrientes a la membrana granulosa y al ovocito. Por fuera de esta capa se encuentra a la teca externa rica en tejido conectivo y fibroblastos.

Estos folículos reciben la denominación de folículos secundarios. Posteriormente, empieza a aparecer espacios entre las células granulosas, consecuencia de la secreción de un material de consistencia líquida por parte de dichas células. Estos espacios posteriores confluyen en una cavidad denominada antro folicular. El cual irá aumentando en tamaño hasta adquirir las características de aquel presente en el folículo preovulatorio o de Graff.

El líquido presente en esta cavidad se lo denomina licor folicular. A partir de la aparición de la cavidad folicular, los folículos reciben el nombre de folículo terciario. El último paso en la aparición del folículo preovulatorio o de Graff, folículo terciario que está en condiciones de ovular.(Figura 20). Otra forma de clasificar los folículos es en folículos preantrales y folículos antrales. Dentro de los primeros encontramos al folículo primordial, primario y secundario, dentro de

los segundos a los folículos terciarios, incluido el folículo preovulatorio o de Graff. (Hafez, 1996).

Figura 20: Etapas del desarrollo folicular.



Fuente: (Dvorkin, M y Cardinali, D. Best y Taylor, 2005)

1.5 PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES

1.5.1 RESEÑA HISTORICA

Durante muchos años se ha trabajado buscando reproducir artificialmente los eventos de maduración ovocitaria llevados a cabo dentro del folículo, así como la fecundación y el desarrollo embrionario temprano en el oviducto de distintos mamíferos. De este modo, lo que en principio solo tenía fines de investigación, en los últimos años se ha confundido con intereses comerciales.

A mediados del siglo pasado comenzó a entenderse con mayor precisión el proceso de fecundación en los mamíferos a través del reconocimiento del fenómeno de capacitación espermática y de la demostración, por primera vez, de la fecundación in vitro en el conejo utilizando espermatozoides obtenidos del útero de conejas 12 hs después de la cópula. A partir de esto, comenzó a trabajarse en la búsqueda de medios capaces de favorecer el crecimiento embrionario hasta el estadio de blastocito el cual una vez transferido a una hembra receptora, pudiera dar lugar a una cría viable. Comenzó entonces a aparecer evidencia acerca de la importancia de componentes específicos que influyen el desarrollo embrionario. En este sentido, (Whittinham y Biggers, 1967) demostraron que cigotos de ratón evolucionaron hacia embriones de dos células en presencia de lactato y piruvato.

Un año después, (Whitten y Biggers, 1968), demostraron que era posible el desarrollo de embriones en un medio "simple y químicamente definido" sin el aporte de sustancias macromoleculares de origen materno. Sin embargo, durante el cultivo, muchos de estos embriones detenían su desarrollo entre 2 y 16 células, dependiendo de la especie en cuestión (Petters, 1992). Este "bloqueo" en el desarrollo, correspondería a una respuesta embrionaria a los efectos adversos o carencias del medio de cultivo en el momento de la transición de la expresión del genoma materno al embrionario (Barnes y Eyestone, 1990).

Por esta razón, los investigadores propusieron cultivar los embriones en oviductos mantenidos en cultivos in vitro, o in vivo en ovejas o conejas. Por otro lado, a mediados de los años 80, otros autores propusieron cocultivar los embriones con células somáticas con el fin de que éstas, pudieran aportar aquellos "elementos" ausentes en los medios de cultivo (Gandolfi y Moor, 1987).

Los resultados de producción in vitro de embriones en distintas especies fueron mejorando significativamente a medida que fueron avanzando los conocimientos acerca de sus requerimientos. Para ello fue necesario transformar los medios de cultivo primitivos, muy complejos y suplementados frecuentemente con suero, en medios más definidos, a través de los cuales cada uno de sus componentes pudiera ser estudiado en función del impacto que generara en el desarrollo embrionario, en

su sobrevida poscriopreservación, en la tasa de gestación, en el porcentaje de crías viables, etc.

Dado que la técnica de producción in vitro de embriones tiene muchas aplicaciones interesantes desde el punto de vista económico o biotecnología), y este último, tanto en animales domésticos como en humanos, su desarrollo justifica la extensión de la investigación en este área.

1.5.2 SISTEMA DE PRODUCCION IN VITRO

El proceso de producción in vitro de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, son en orden cronológico:

1. Maduración de ovocitos
2. Fecundación de los ovocitos madurados
3. Cultivo de embriones

Estos tres pasos fundamentales se establecen a partir de ovocitos obtenidos básicamente de ovarios provenientes de matadero, vacas castradas o, más recientemente, de vacas vivas mediante la técnica de punción folicular guiada por ultrasonografía (OPU, ovum pick up). Luego de la fecundación, se continúa con el cultivo de los presuntos cigotos, culminando 7 a 9 días más tarde con la producción de blastocistos o blastocistos expandidos aptos para ser transferidos o criopreservados.

Estos tres pasos, comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos, y donde cada uno condiciona el éxito o el fracaso del siguiente.

1.6 COLECCION DE OVOCITOS

Los ovarios de bovino contienen miles de ovocitos, pero con la tecnología actual solo una pequeña porción de ellos se pueden utilizar.

Se sugiere que los ovarios recopilados del matadero, pueden almacenarse para su transporte al laboratorio hasta un máximo de 11 horas en una solución salina de cloruro de sodio al 0.9 % conteniendo: penicilina 100.00 U.I., estreptomina 100 mg y amfotericina B 250 ug por litro (Lab SIGMA), mantenida entre 25 y 35° C. de esta forma los resultados de maduración y fecundación *in-vitro* de los oocitos no se verán comprometidos: asimismo, el subsiguiente desarrollo embrionario (Palomino, 2000).

El procedimiento más utilizado para la recolección de oocitos en el laboratorio es por punción y aspiración del contenido de los folículos, usando una pipeta o jeringa de 10 ml (Palomino, 2000).

Solamente los folículos entre 2 a 8 milímetros (mm) de diámetro proporcionan ovocitos con un buen porcentaje de desarrollo (Gordon y Lu, 1990), ya que los ovocitos adquieren la habilidad de iniciar la meiosis cuando llegan al 80% de su tamaño final (Gordon, 1994).

Los ovocitos recuperados de folículos menores a 1.6 mm están en crecimiento y todavía no han alcanzado un estado meióticamente competente (Motlik y Fulka, 1986), por lo que los ovocitos obtenidos de folículos menores a 2 mm presentan una reducción en el porcentaje de maduración y fertilización comparados con folículos mayores (Hawk y Wall, 1994).

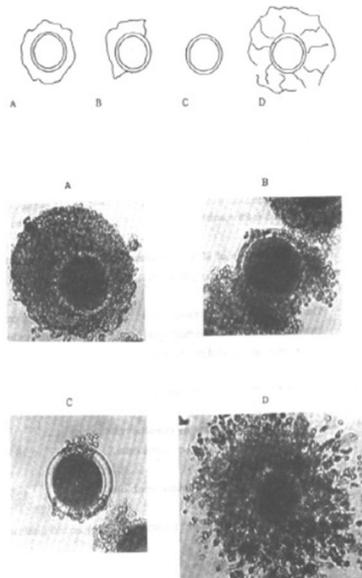
El máximo número de ovocitos recuperados por ovario, utilizando folículos mayores a 2 mm, son cerca de 10. Se ha encontrado que los ovarios de vacas proveen un menor número de ovocitos aceptables que las vaquillas productoras de carne, que son sacrificadas a los 2 a 3 años de edad (Gordon y Lu, 1990).

1.7 CLASIFICACION DE OVOCITOS

Para la clasificación de ovocitos para MIV y FIV, morfológicamente se clasifican en 4 categorías.

La categoría uno(A), la constituyen los ovocitos que poseen un cumulus oophorus denso, cubriendo la totalidad del diámetro del ovocito y un citoplasma finamente granular y obscuro. La categoría dos (B), la constituyen (los ovocitos parcialmente cubiertos con COC y además estas se encuentran algo expandidas. La tercera (C) categoría carece de COC. La cuarta (D) categoría esta rodea por fibrina.(Figura 21)

Figura 21: Categorías de ovocitos.



Fuente: Filipiak, 2010

En la figura 21, se muestra el criterio de clasificación de (Leibfried y First, 1979 y Fry, 1997), y también mencionan que la presencia de un cumulus completo tiene importancia en el desarrollo de los ovocitos inmaduros, que se contactan con las células somáticas por medio de prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa. Esto permite el ingreso de aminoácidos y otros nutrientes que en forma pasiva no atraviesan la ZP. Solo los ovocitos con un cumulus compacto y denso serán capaces de completar el desarrollo.

Con el aumento del tamaño folicular disminuye el número de capas de COC. Leibfried y First (1979) en sus investigaciones, encontraron que la habilidad de los ovocitos para alcanzar la maduración in vitro no depende ni del tamaño del folículo ni del estadio del ciclo estral, siendo determinante sin embargo, la presencia de un citoplasma intacto. Por otro lado, la habilidad de los ovocitos para madurar in vitro puede depender del estadio del ciclo estral o del tamaño de los folículos de donde son extraídos.

1.8 MADURACION DE LOS OVOCITOS

Los ovocitos situados en los folículos ováricos se encuentran en el estadio de diploteno correspondiente a la profase de primera división meiótica. La prosecución de la meiosis y su maduración final ocurre dentro del folículo preovulatorio bajo el estímulo del pico preovulatorio de la Hormona Luteinizante (LH) e incluye la finalización de dos programas celulares, que transcurren en el núcleo y el citoplasma (Hytel et al., 1997).

Durante la maduración nuclear, el ovocito reinicia la meiosis hasta quedar detenido nuevamente en metafase de la segunda división meiótica, la cual solo prosigue posterior a la fecundación (Hafez, 1987), La maduración citoplásmica se encuentra relacionada con la habilidad del ovocito para contribuir en la formación del pronúcleo masculino luego de la penetración del espermatozoide, así como con la adquisición de la capacidad para el desarrollo posterior (Bavister, Rose-Hellekant y Pinyopummintr, 1992; Van Soom y de Kruif, 1996).

En los últimos años, se ha podido demostrar, que la adquisición de capacidad (competencia) para desarrollar es un proceso que comienza mucho antes del período periovulatorio, antes de la ruptura de la vesícula germinal (germinal vesicle breakdown). En este sentido, se ha demostrado que ovocitos contenidos en folículos antrales de más de 5-6 milímetros presentan una mayor capacidad para desarrollar respecto a aquellos contenidos en folículos de menor diámetro (Lequarre et al., 2005). En este sentido, (Lonergan et al. 1994) informó una tasa de producción de embriones de 66% a partir de ovocitos obtenidos de folículos mayores de 6 mm y de 34% con aquellos provenientes de folículos menores de

6mm. Recientemente, utilizando estos conceptos se han desarrollado protocolos de estimulación ovárica en bovinos tendientes a aumentar la presencia de folículos de mayor diámetro al momento de la punción folicular (ovum pick up) con los que se han obtenido tasas de producción de embriones hasta un 80% (Blondin et al., 2002).

Cuando los ovocitos son aspirados desde los folículos terciarios (folículos antrales) reanudan espontáneamente la meiosis (Bevers et al., 1997), y al ser cultivados in vitro continúan con los procesos de maduración mencionados. De este modo, la composición de los medios y el ambiente controlado por estufas de cultivo, deben brindar un ambiente adecuado para que la maduración ocurra en 24 hs de un modo similar a lo que sucede in vivo durante más de dos ciclos estrales en el bovino. Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios, para lograr este ambiente, involucran el uso de medios de cultivo tales como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc.), antioxidantes (glutatión, cisteamina, cistina), factores de crecimiento (EGF) y macromoléculas (suero, albúmina, hialuronan), en una atmósfera de 5 % CO₂ 38,5° C; y humedad a saturación (Galli, 2003).

Dado que la apropiada maduración final del ovocito condicionan entre otras cosas la aptitud para ser fecundados y para el desarrollo posterior del cigoto, en la actualidad se trabaja intensamente en la búsqueda de claves que permitan entender cuáles son los mecanismos biológicos que operan durante esta etapa. De este modo, podría lograrse una mejora en los resultados del proceso global de producción in vitro de embriones (Watson et al., 2000), así como en la sobrevivencia de aquellos que fueron criopreservados (Rizos et al., 2002).

1.9 FECUNDACION DE LOS OVOCITOS

Bajo condiciones in vivo, la fecundación del ovocito ocurre posterior a una serie de importantes procesos tales como deposición, colonización, y transporte de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino, capacitación y selección espermática, etc. Todos estos determinan en última instancia la interacción

ovocito-espermatozoide dentro del oviducto, culminando posteriormente con la formación del cigoto.

En el caso de la fecundación in vitro, los ovocitos madurados son cocultivados con espermatozoides en medios especiales y en un ambiente controlado por estufas de cultivo por un tiempo comprendido entre 5 y 24 hs dependiendo del protocolo, la concentración de espermatozoides y la calidad del semen utilizado.

Con el fin de lograr los procesos de capacitación, reacción del acrosoma y pasaje a través de las barreras ovocitarias, el semen debe ser tratado rápidamente antes de cocultivar los espermatozoides con los ovocitos. Este tratamiento incluye la eliminación de todos los elementos presentes (plasma seminal, componentes del diluyente en el caso de semen congelado-descongelado, contaminantes, etc.) excepto los espermatozoides, y una selección de los espermatozoides vivos y con motilidad progresiva. Esto se logra mediante técnicas basadas en la migración de los espermatozoides (swim-up), la centrifugación en gradientes de densidad (Percoll, Ficoll, Nicodenz) y filtración (Lana de vidrio, partículas de sephadex, membranas). De estas las más utilizadas son el swim up Percoll® (las mencionadas técnicas se describen en detalle en el apartado "metodología de fecundación in vitro de ovocitos bovinos").

Posteriormente se procede a iniciar el proceso de capacitación espermática que habitualmente se establece dentro del tracto reproductor femenino. Los dos elementos que juegan un rol importante para que esto se logre in vitro son:

Incorporación de sustancias inductoras de la capacitación espermática como la heparina (Parrish, Susko-Parrish y First, 1989).

Utilización de semen congelado-descongelado, proceso que induce cambios procapacitantes en los espermatozoides así conservados (Bailey, 2000).

Por último, se efectúa la dilución y el conteo de los espermatozoides motiles para alcanzar habitualmente, una dosis inseminante de 1 a 6 millones de espermatozoides/ml de medio de fecundación dependiendo del protocolo utilizado. En este sentido, hemos obtenido buenos resultados utilizando 3-4 y 1-2

millones para fecundaciones de 6 y 24 hs respectivamente, cuando el semen descongelado fue acondicionado con percoll.

1.10 CULTIVO EMBRIONARIO

El cultivo embrionario es la etapa en la que los ovocitos fecundados desarrollan hasta el estadio de blastocisto o blastocisto expandido.

Luego de la maduración in vitro, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar. De estos, aproximadamente el 80% son fecundados y comienzan a dividir, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanzan el estadio de blastocisto o blastocisto expandido (Bavister, 1992; Lonergan, 2001). Esto podría sugerir que el cultivo embrionario, correspondiente al paso más prolongado dentro del proceso de producción in vitro, es el principal período que determina la eficiencia global del sistema, así como la calidad de los embriones obtenidos (Galli et al., 2003).

Existen en la actualidad numerosos medios de cultivo disponibles para permitir el desarrollo de los embriones bovinos in vitro, y aunque es posible alcanzar estadios preimplantacionales avanzados mediante la utilización de los mismos, la cantidad y la calidad, comparados con los obtenidos in vivo, aún no son del todo satisfactorias (Galli et al., 2003).

Claramente, las condiciones generadas en los medios de cultivo no pueden imitar totalmente el ambiente presente dentro del tracto reproductor femenino (Bavister, 2000).

Los sistemas de cultivo in vitro de embriones pueden ser clasificados de acuerdo a diversos criterios.

- **Con co-cultivo**
- **Definido**
- **Sin co-cultivo**
- **No definido**

- **Secuenciales**

- **No secuenciales**

El co-cultivo involucra la asociación de los cigotos con otro tipo de células en el medio de cultivo. Para ello se utilizan células somáticas tales como células de la granulosa u oviductales, que al desarrollar pueden producir y liberar factores de crecimiento, hormonas, etc., que podrían favorecer el desarrollo embrionario temprano.

Sin embargo, se ha propuesto que además de efectuar los mencionados aportes al medio, las células somáticas podrían remover sustancias tóxicas (Bavister, et al., 1992; Thompson, 1996) o disminuirla tensión de oxígeno en el microambiente que rodea al embrión (Yuan et al., 2003).

En este último caso, se disminuiría la formación de especies reactivas del oxígeno, las cuales perjudican el metabolismo y el desarrollo embrionario temprano (Yuan et al., 2003). Actualmente, los cultivos se realizan en estufas que controlan el CO₂ y el O₂ para lograr un ambiente con presiones parciales entre 40 y 60 mmHg, las cuales son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas (Leese, 1988; Fischer y Bavister, 1993).

Los medios definidos y no definidos, hacen referencia a aquellos en donde se tiene conocimiento o no de todos los componentes con los cuales son preparados, respectivamente.

Según Thompson (1996), el ambiente que rodea a los embriones en cultivo, en última instancia está determinado por ellos mismos, con lo cual el término "medio definido" sería en cierto modo cuestionable.

En este sentido, la formulación y utilización exitosa de medios como el SOF (Synthetic Oviduct Fluid. Tervit, Whittingham y Rowson, 1972) y el CR1 (Rosenkrans y First, 1994), contribuyeron al inicio de la utilización de medios más definidos y en ausencia de co-cultivo, con los cuales se pudo avanzar en el entendimiento del rol de los distintos nutrientes en el desarrollo embrionario temprano.

En la actualidad, los medios de cultivo tienden a ser de composición definida, lo cual ayuda a determinar los requerimientos específicos de los embriones y hacen posible la repetibilidad de los resultados.

La clasificación de los medios de cultivo en secuenciales o no secuenciales es un criterio adoptado en los últimos años apoyado por la creciente evidencia acerca de cambios en los requerimientos y utilización de los nutrientes por parte de los embriones a lo largo del cultivo (Gardner y Lañe, 1998).

De este modo, los medios estáticos son aquellos sobre los cuales no se efectúan modificaciones a lo largo del cultivo, mientras que los secuenciales son aquellos en los cuales la composición va siendo modificada, mediante la adición de sustancias o el recambio del medio en función de los requerimientos, o para eliminar productos del metabolismo embrionario que podrían afectar su viabilidad (Gardner, 1998; Cooke et al., 2002; Lañe et al., 2003; Gardner y Lañe, 2003).

1.11 COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

1.11.1 PARAMETROS BIOFISICOS Y ELEMENTOS INORGANICOS

Pese a la gran variedad de medios de cultivo desarrollados en los últimos años, diversos autores (Menezo y Khatchadourian, 1991; Cordón, 1994; Palasz, 1996; Thompson, 1996) coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes a controlar son los siguientes:

- **Osmolaridad.** Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/Kg. Actualmente se dispone de información que indica que una disminución de la osmolaridad a valores de 245 mOsm/Kg, beneficiaría el desarrollo embrionario (Anbari y Schultz, 1993; -Duque et al., 2003). Estudios previos indicaron que una disminución de la osmolaridad está ligado a un aumento de la síntesis de ARN mensajero de genes de la

familia de la IGF-1 (Ho et al., 1994), lamininas y transportadores de glucosa (Shim et al., 1996).

- **pH.** La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados in vitro desarrollan a pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7,2 y 7,6.
- **C02 y 02.** La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% O₂ en aire para la maduración ovocitaria y fecundación, y 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ para el desarrollo embrionario.

El fluido oviductal bovino y ovino, se caracteriza por bajos niveles de Na y altos niveles de K comparados con los niveles plasmáticos, en una relación 0,032. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como, magnesio, calcio, bicarbonato, sulfates y fosfatos.

El agua es el componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo, y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario (Cordón, 1994; Marquant - Leguienne y Humblot, 1998). Dado que existe una relación directa entre la pureza del agua y su resistencia eléctrica, esta se transformado en el indicador más común para evaluar su calidad. La mayor resistencia ofrecida por el agua al paso de la corriente eléctrica ocurre en el agua ultrapura y corresponde a 18,3 megaohms a 25° C (Palasz, 1996). Las fuentes de agua utilizadas han sido el agua de lluvia, la obtenida -por sucesivas destilaciones (Boone y Shapiro, 1990), o actualmente la producida por sistemas de purificación que utilizan el principio de osmosis reversa. En todos los casos no se recomienda almacenar por largos períodos el agua que va a ser utilizada en medios de cultivo debido a la contaminación con metales pesados liberados desde los envases de plástico o vidrio (Boone y Shapiro, 1990; Palasz, 1996).

1.11.2 COMPUESTOS ORGANICOS

Estos compuestos constituyen los elementos más controvertidos en la literatura desde los comienzos de la producción in vitro de embriones. En la actualidad, existe una gran cantidad de información, no siempre coincidente, acerca del uso de ciertas hormonas, factores de crecimiento, compuestos macromoleculares, etc., sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo tres componentes orgánicos son casi constantes en las formulaciones finales de los medios de cultivo utilizados corrientemente en producción in vitro. Estos son:

- Fuentes de energía.
- Aminoácidos.
- Fuente de proteínas.

1.11.3 FUENTES DE ENERGIA

Los embriones de varios mamíferos (ratón, hámster, oveja, vaca, y humano) presentan cambios en la demanda de nutrientes a medida que evolucionan en su desarrollo (Gardner, 1998), y este patrón metabólico sería similar para embriones producidos in vitro e in vivo (Khurana y Niemann, 2000). Pese a esto, las fuentes de energía más utilizadas en los medios de cultivo de embriones son, en general, la glutamina, el lactato, el piruvato y la glucosa (Palasz, 1996).

Se ha demostrado que durante los primeros estudios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizarían preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa posterior al periodo mencionado (Rieger, 1992; Overström, 1996; Palasz, 1996, Gardner, 1998; Krisher y Bavister, 1998; Lañe y Gardner, 2000; Thompson, 2000).

La falta de utilización de la glucosa durante los primeros estudios estaría dada por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa (Gardner, 1998). Esta enzima, acelera la glucólisis catalizando la formación de fructosa 1-6 bifosfato a partir de fructosa 6 fosfato, y se encuentra controlada alostéricamente por el cociente ATP-ADP (Mayes, 1992) (Gráfico 2), particularmente alto en este periodo (Gardner, 1998).

En esta etapa, la adición de glucosa a los medios de cultivos no solamente no sería aprovechada, sino que a su vez generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario (Takahashí y First, 1992). Sin embargo, a partir del estadio de 8-16 células, en embriones bovinos (Rieger, Loskutoff y Betteridge, 1992), y en respuesta a una alta demanda de energía necesaria para la compactación, formación y expansión del blastocele (Gardner, 1998), el cociente ATP-ADP podría disminuir, y con ello la inhibición ejercida sobre la enzima mencionada, con lo cual aumentaría el consumo de glucosa. Este metabolito también participa en la síntesis de precursores de ácidos nucleicos y de lípidos (Gardner y Lañe, 1998), y su disponibilidad sería importante durante la protrusión fuera de la zona pelúcida (Menezo y Khatchadourian, 1991; Overstrom, 1996).

Con respecto a los lípidos, se sabe acerca de la importancia que tendrían en la formación de energía durante el desarrollo embrionario temprano (Thompson, 1996. Thompson, 2000). Sin embargo, se ha debatido la posibilidad de mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados a través de la adición de ciertos componentes lipídicos a los medios de cultivo, específicamente ácido linoleico, no como fuente energética, sino como fluidificador de las membranas plasmáticas (Imai, Kobayashi, Goto, Dochi, Shimohira, 1997; Hochi, Kimura y Hanada, 1999).

1.11.4 AMINOACIDOS

Rosenkrans y First (1994) demostraron por primera vez el beneficio de la adición de aminoácidos esenciales y no esenciales (clasificación de Eagle, 1959) de origen fibroblasto a un medio de cultivo libre de suero (CRlaa), sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. Según Gardner y Lañe (1998), los aminoácidos se encuentran dentro de los elementos más importantes como participantes de la regulación del desarrollo embrionario.

Estos elementos, serían utilizados como fuente de energía, como buffer para mantener el pH constante y como pool para la síntesis de proteínas (Rosenkrans y First, 1994; Palazs, 1996; Lane y Gardner, 1998), siendo incorporados por

transportadores de membrana específicos regulados en función del estadio de desarrollo o en respuesta a señales externas (Van Winkle, 2001).

Los medios de cultivo complejos comúnmente utilizados como el TCM-199 o Ham's F-10, contienen los 20 aminoácidos, y aunque los resultados en producción de embriones han sido satisfactorios, sus funciones específicas no son del todo conocidas (Takahashi y First, 1992).

Se ha podido demostrar que los aminoácidos no esenciales favorecerían el desarrollo en estadios tempranos, mientras que los esenciales harían lo mismo en embriones de más de ocho células (Gardner, 1998; Thompson, 2000; Van Winkle, 2001). Este cambio en la utilización de aminoácidos, pareciera deberse a requerimientos específicos de las células embrionarias, en donde las células trofoblásticas utilizarían aminoácidos no esenciales y glutamina, mientras que, las de la masa celular interna, tendrían preferencia por los esenciales (Lañe y Gardner, 1998).

1.11.5 SUPLEMENTACION PROTEICA

La introducción del cocultivo permitió aliviar el problema del bloqueo del desarrollo embrionario en sus primeros estadios. Sin embargo, estos sistemas fueron desarrollados para permitir el crecimiento de líneas celulares somáticas específicas, las cuales requerían la adición de suero para soportar sus requerimientos. De este modo, se trasladó su utilización a los sistemas de producción *in vitro* de embriones (Gardner, 1999) y desde entonces usualmente se agrega suero bovino y/o la BSA como fuente de proteínas a los medios de cultivo de embriones bovinos (Carolan et al., 1995; Wang et al, 1997), aunque los resultados en producción o en sobrevivencia poscriopreservación son contradictorios y motivo de numerosos estudios.

El suero constituye la fracción líquida resultante del proceso de coagulación sanguínea, tanto *in vivo* como *in vitro* (Guyton, 1991), y su calidad, en términos de composición química, depende usualmente del tipo y estado del donante (suero de ternero recién nacido, suero de novillo o vaca, suero fetal bovino, suero de vaca

en celo, etc.) y de la partida o lote de formulación (Pinyopummintr y Bavister, 1994)

La BSA es una proteína plasmática de carácter ácido, soluble en agua, con un peso molecular aproximado de 69000, y constituye uno de los componentes más importantes del suero sanguíneo. Debido a la presencia de grupos reactivos en su molécula, puede unirse a diferentes sustancias (ácidos grasos, hormonas, etc.) y transportarlas en sangre hasta sus órganos blanco (Blanco, 1991). Junto con la inmunoglobulina G, son las proteínas más abundantes del fluido oviductal (Leese, 1988), y su pureza puede variar entre lotes (Kane y Headon, 1980; Rorie et al., 1994).

Algunos de los efectos benéficos que justifican la utilización de estos componentes son: proteger a los embriones en cultivo de sustancias tóxicas (ej. metales pesados).

Aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas que promueven la proliferación y diferenciación celular.

Reducir la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental (placas de cultivo, pipetas, tubos etc.).

En el caso del suero, aumentar cuantitativamente la producción de embriones y acelerar su crecimiento (Van Langendonck et al. 1997; Thompson et al., 1998).

Tanto el suero como la BSA, tienen un rol similar como suplemento proteico. Sin embargo, la posible presencia de elementos no identificados ligados a ambos determina que algunos aspectos de su función no sean aún completamente comprendidos. Al mismo tiempo, estos compuestos son considerados variables e indefinidos (Gardner y Lañe, 1998), lo cual podría generar variaciones en la composición de los medios utilizados y de este modo interferir con la repetibilidad de los resultados obtenidos.

En los últimos años, estos componentes han sido objeto de numerosos estudios, tendientes a definir si la adición de ellos es definitivamente necesaria para mejorar

los resultados de producción in vitro, en función de la cantidad y calidad de los embriones obtenidos.

Se ha observado que la adición de suero a los medios de cultivo tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadios y estimulando la compactación de mórulas y el desarrollo de blastocistos (Bavister et al., 1992; Pinyopummintr y Bavister, 1994; Thompson et al., 1998a). Al mismo tiempo, su empleo también se ha visto relacionado con un adelanto en la aparición de mórulas y blastocistos (Carolan et al., 1995; Van Langendonck et al., 1997; Gómez y Diez, 2000), asociado a un número mayor de blastómeros (Bavister et al., 1992; Lim et al., 1994; Van Langendonck et al., 1997) y a una mejora en la tasa de producción y protrusión (Takagi et al., 1992; Lim, Rocha y Hansel, 1996; Wang et al., 1997; Gómez y Diez, 2000). Sin embargo, otros autores observaron que, tanto la tasa de producción (Rorie et al., 1994) como el número de blastómeros (Thompson et al., 1998a; Gómez y Diez, 2000) no se afectaron por la presencia o ausencia de suero. En cambio Byrne et al. (1999) y Ferguson y Leese (1999) encontraron una disminución en esta última variable adicionando suero en los medios de cultivo.

Algunos efectos negativos que han sido atribuidos al uso de suero en los medios de cultivo: son alteraciones mitocondriales (Dorland et al., 1994; Abe et al., 1999a; Farin et al. 2001), excesiva producción de lactato, presencia de células oscuras y granuladas en la masa celular interna (Bavister et al. 1992; Thompson, 1997; Krisher, Lañe y Bavister, 1999), aumento de células apoptóticas (Byrne et al., 1999) y disminución del número de complejos de unión entre los blastómeros (Shamsuddin y Rodriguez-Martinez, 1994). Además, observaron alteraciones durante la preñez en hembras receptoras transferidas que gestan embriones producidos con suero tales como alargamiento del período de gestación (Thompson et al., 1995) y nacimiento de terneros con peso superior a lo normal (large offspring síndrome) (Thompson et al., 1995; Walker et al., 1996; Young et al., 1998; Gardner, 1999). Datos recientes indicarían que la presencia de suero puede disminuir la expresión de genes de particular importancia para el desarrollo

embrionario temprano como el de la conexina 43, y para el reconocimiento materno de la preñez como el interferón (Rizos et al., 2003).

Estudios efectuados sobre embriones producidos in vitro indican que existiría una mayor cantidad de lípidos (Pollard y Leibo, 1994; Thompson et al., 1995; Ferguson y Léese, 1999; Abe et al., 2002), así como diferencias en su composición (Ferguson y Léese, 1999; Sata et al., 1999) dentro de las gotas citoplásmicas de los embriones suplementarios con suero. Esto podría contribuir a la mayor sensibilidad que estos presentan a la criopreservación, comparados con los obtenidos in vivo o producidos in vitro sin suplementar con suero (Dinnyés et al., 1996; Dobrinsky, 1996; Holm et al., 1996; Abe et al., 1999; Ferguson y Léese, 1999; Abd El Razek et al., 2000; Enright et al., 2000; Cho, et al., 2001; Farin et al., 2001; Kim et al., 2001). Estudios efectuados sobre el cultivo de embriones producidos in vitro demostraron que estos presentan una baja sobrevivencia poscriopreservación cuando son suplementados con suero luego de la congelación-descongelación (Semple, Betteridge y Leibo, 1995; Yamashita et al., 1999; Abe et al., 2002) como después de la vitrificación-calentamiento (Ohboshi et al., 1997; Yotsushima et al., 1999; Rizos et al., 2003). Sin embargo, existe escasa información acerca de los efectos de la interacción de sistemas de criopreservación (congelación y vitrificación) con medios de cultivo (con suero y sin suero).

Todos estos datos sugieren que el empleo de medios de cultivo libres de suero, podría ser beneficioso para mejorar la calidad de los embriones producidos, principalmente si son destinados a la criopreservación, evitando asimismo, los otros problemas mencionados.

La BSA es utilizada desde hace varios años como suplemento proteico en la producción in vitro de embriones de varias especies. Anteriormente, los medios libres de suero, suplementados con albúmina, eran denominados "definidos" (Whitten y Biggers, 1968). Poco a poco tal denominación fue dejándose de lado al demostrarse que, en virtud de la función que cumple esta proteína en el organismo, muchas veces ésta puede estar contaminada con otras sustancias como hormonas, ácidos grasos, etc.

Actualmente, el rol de la albúmina en el desarrollo embrionario es fuertemente cuestionado. Thompson (2000) sostiene que la misma desempeñaría funciones intracelulares, como por ejemplo, disminuir el consumo de oxígeno, aumentar la incorporación de piruvato y deprimir su destino a la vía de los ácidos tricarbónicos, reducir el contenido proteico dentro del embrión, etc. Algunos autores mencionan que la albúmina per se estimula el desarrollo embrionario (Tornesi y Archer, 1993; Lim et al., 1996), mientras que otros niegan estos efectos y se lo atribuyen a sustancias que probablemente sean vehiculizadas por esta proteína (Kane y Headon, 1980).

Otro punto importante respecto a la utilización del suero y la albúmina, es que estos componentes pueden constituirse en la mayor fuente de contaminantes del medio de cultivo, por lo que su uso aumenta el riesgo potencial de transmisión de enfermedades por vía de los embriones (Thompson, 1998). En la actualidad se está comenzando a utilizar albúmina recombinante con el fin de disminuir estos riesgos, así como la variabilidad entre partidas, obteniendo resultados aceptables desde el punto de vista cuantitativo (tasa de producción) y cualitativo (número de blastómeros, relación masa celular interna-células trofoblásticas, sobrevivencia poscriopreservación) (Lane et al., 2003).

Si bien no está totalmente claro cuál es el rol endocelular por el que actuarían la albúmina y el suero, algunas de sus propiedades físicas podrían ser reemplazadas mediante la utilización de sustancias definidas. El uso de polímeros sintéticos como el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona es frecuente desde hace varios años en la producción in vitro de embriones (Ectors et al., 1992; Gardner y Lañe, 1998). Estos compuestos han demostrado proveer una buena actividad surfactante, similar a la albúmina, aunque se ha encontrado una menor tasa de producción de embriones y diferencias metabólicas importantes entre embriones cultivados con o sin este componente (Thompson, 2000).

Finalmente, se ha observado un menor porcentaje de gestación logrado con embriones producidos en medios suplementados con estos compuestos comparado con los obtenidos con embriones cultivados con suero (Jakobsen et al., 1999).

Otro compuesto utilizado con el fin de reemplazar la albúmina o el suero ha sido en hialuronato el cual ha demostrado resultados muy alentadores (Gardner, 1998).

Actualmente existen en el mercado compuestos formulados con el fin de reemplazar el suero en los medios de cultivo de distintas líneas celulares. (Duque et al. 2003) demostraron que es posible producir embriones in vitro utilizando Ultroser (Invitrogen), un sustituto del suero fetal bovino, y CPSR-3 (Controlled Process Serum Replacement, SIGMA) el cual se obtiene por dializado del plasma bovino. Estos autores observaron que, el reemplazo del suero por Ultroser disminuyó significativamente la producción in vitro de embriones bovinos, mientras que utilizando CPSR-3 no obtuvieron diferencias en esta variable como tampoco en el número total de blastómeros.

De este modo se abre un nuevo camino en el entendimiento de los requerimientos de los embriones en estadios preimplantacionales, en el cual, el uso de medios definidos y libres de macromoléculas de origen biológico altamente variables, tendrán seguramente un rol muy importante. Esto deberá permitir aumentar la calidad de los embriones producidos in vitro asemejándolos a los patrones de mejor calidad correspondiente a aquellos obtenidos in vivo.

1.12 NUEVAS METODOLOGIAS DE CULTIVO

La producción in vitro (PIV) de embriones bovinos a partir de ovarios provenientes de matadero, es una biotécnica bien establecida, que permite alcanzar en promedio, un 30-40% de desarrollo embrionario, respecto a los ovocitos puestos en cultivo. Sin embargo, estos resultados se encuentran fuertemente influenciados por un número variable de factores tales como el co-cultivo con células somáticas (Donnay et al., 1997), adición de antioxidantes (Ali et al., 2003), tensión de oxígeno (Van Soon et al., 2002), o tipo de medio de cultivo embrionario (CR1 (Rosenkrans y First, 1994); SOF (Tervit et al., 1972); KSOM (Lawitts y Biggers, 1993).

Otro factor, está dado por el número de ovocitos o embriones presentes en cada gota de medio de cultivo, habiéndose informado un mayor desarrollo cuando los

embriones son cultivados en grupos, comparados con el cultivo individual o en pocos números (O'Doherty et al., 1997; Vajta et al., 2000).

En los últimos años, se han efectuado numerosas investigaciones tendientes a identificar el comportamiento de las estructuras cultivadas en distintos medios de cultivo (CR1, SOF, KSOM), introduciendo o no modificaciones respecto a sus formulaciones originales. Así, por ejemplo, se ha visto que una disminución en la concentración de CINA en estos medios, tendría un efecto benéfico en el desarrollo embrionario (Li y Foote, 1996; Duque et al., 2003).

La disminución de la concentración de CINA sin efectuar variaciones en la concentración de CIK, permitiría alcanzar una relación Na/K, similares a las encontradas en el oviducto bovino (Palasz, 1996; Menezo y Guerin, 1997). Al mismo tiempo, es posible que una disminución de la osmolaridad de los medios de cultivo, permita amortiguar en cierto modo, posibles aumentos de la misma cuando se trabaja con pequeños volúmenes, más aún cuando los cultivos no son cubiertos con aceite mineral (cultivo en capilares).

Con el advenimiento de la punción folicular guiada por ultrasonografía (ovum pick up;OPU) ha sido posible recuperar ovocitos a partir de donantes vivas, y esto, a su vez, ha permitido aumentar la aplicación comercial de la PIV de embriones bovinos. Sin embargo, mediante la OPU, solo es posible recuperar un bajo número de ovocitos, los cuales deben, a su vez, ser manejados de manera individualizada en los sistemas in vitro, con el propósito de garantizar el origen (genética) de los embriones producidos.

En los últimos años se han desarrollado varias metodologías tendientes a mejorar los resultados de la PIV a partir del cultivo de ovocitos individuales. Los mismos fueron diseñados bajo la hipótesis de un efecto cooperativo de las estructuras cultivadas, en donde las mismas producirían distintos mediadores que estimularían, por mecanismos autócrinos o parácrinos, el desarrollo y la protrusión embrinaria. De este modo, ajustando la densidad de estructuras cultivadas al volumen del medio de cultivo, podría ser posible obtener resultados similares a los obtenidos cultivando en grupos mayores.

Así, Caroián et al. (1996) informaron resultados de producción de embriones similares a los controles (cultivo en grupos), efectuando la maduración, fecundación y cultivo de ovocitos individuales en microgotas (10-20 µl). Vajta et al. (2000) informaron un nuevo sistema de cultivo, específicamente diseñado para el cultivo individual de ovocitos fecundados, denominado WOW (well of the well). Este sistema consiste en la confección de pequeños hoyos en el fondo de cada celda (well).

De placas de cultivo, donde son colocados y cultivados los ovocitos fecundados, de manera individualizada. Con este sistema, los autores mencionados informaron resultados superiores a aquellos obtenidos con los grupos control (cultivo en grupos) inclusive con los cultivos en microgotas. Más recientemente, Thouas et al. (2003), describió un sistema de cultivo de cigotos de ratón obtenidos *in vivo*, en el cual, dos cigotos eran incluidos dentro de capilares de vidrio en un volumen de 1 µl de medio de cultivo. Con este sistema, informaron resultados superiores a los grupos control (cultivo de 10 cigotos en microgotas de 20 µl).

1.13 FUTUROS ESTUDIOS

1.13.1 ESTUDIOS GENOMICOS

La producción *in vitro* de embriones ha posibilitado importantes avances en el entendimiento de las variables que operan durante el desarrollo embrionario temprano de muchas especies de interés. Esto ha permitido la introducción de estos embriones en programas de mejora genética, adquiriendo así, además de la importancia referida a los fines de estudio, una creciente connotación desde el punto de vista comercial.

El momento crítico del desarrollo de los embriones bovinos en los sistemas *in vitro* se encuentra en el estadio de 8-16 células. En este estadio, se produce el proceso denominado "activación del genoma embrionario". A su vez, el programa de desarrollo contenido en el ovocito, a través de la acumulación de proteínas y

ARN durante la maduración final y adquisición de competencia, parece ser el responsable de la ejecución apropiada del mencionado proceso.

En los últimos años, se han efectuado estudios tendientes a aumentar la eficiencia de la técnica en términos de tasa de producción de embriones, sobrevivencia poscriopreservación, tasas de gestación, entre otros. Muchos de estos trabajos, han sido dirigidos a mejorar las condiciones de cultivo de los ovocitos fecundados, habiéndose efectuado sobre los embriones obtenidos, estudios de expresión génica utilizando distintos medios de cultivo o incluso comparándolos con los obtenidos in vivo.

Sin embargo, a pesar de los conocimientos que han brindado estos y otros estudios en conjunto, la tasa de producción de embriones permanece estable en alrededor del 35% respecto a los ovocitos puestos a madurar.

En este sentido, solo modificaciones en los tratamientos de estimulación ovárica, sumado a la punción folicular guiada por ultrasonografía, han demostrado ser efectivos en cuanto al incremento de la mencionada tasa, alcanzando resultados similares a los reportados in vivo (Blondín et al., 2002) De este modo, se ha podido demostrar que la calidad intrínseca y las condiciones de maduración de los ovocitos constituyen un factor condicionante de la calidad y cantidad de los embriones obtenidos.

A su vez, la competencia para el desarrollo por parte del ovocito se encuentra directamente relacionada al tamaño del folículo que lo contiene, y que el período periovulatorio constituye el punto de máxima adquisición de la misma. (Hendriksen et al., 2000). Si bien estos últimos conceptos se encuentran respaldados por numerosos estudios de producción de embriones y evaluación ultraestructural de ovocitos, e incluso de evaluación de la expresión de ciertos genes, entre otros, existe escasa de información relacionada a la expresión génica diferencial de ovocitos ovinos madurados in vivo o in vitro, obtenidos de hembras sujetas a distintos tratamientos de estimulación ovárica o madurados con distintos tipos de inhibidores de la meiosis.

El propósito de estos tratamientos sería brindarles a los ovocitos una mejor maduración y adquisición de la capacidad para desarrollar luego de la fecundación. El propósito de futuros trabajos será describir la expresión génica-diferencial de ovocitos madurados in vivo y compararla con la de aquellos madurados in vitro obtenidos por punción en distintos estadios de la foliculogénesis.

Se intentará identificar en cada caso los genes responsables de la adquisición de la capacidad final de desarrollo. Se espera que la información generada permita aumentar la eficiencia de los sistemas de producción in vitro de embriones bovinos.

1.13.2 ESTUDIOS POSGENOMICOS

La evaluación por métodos no invasivos de la calidad de ovocitos y embriones es considerada en la actualidad como una meta fundamental para optimizar los resultados de las biotécnicas de reproducción asistida en humanos y en animales domésticos.

En este sentido, las ciencias "ómicas" (transcriptómica, genómica, proteómica, metabolómica, etc.), han comenzado a proveer evidencias que indican que tanto las gametas como los embriones viables presentan perfiles moleculares característicos (Katz-Jaffe et al., 2009). Estos perfiles, una vez caracterizados podrían ser utilizados como **biomarcadores** para seleccionar estructuras por viabilidad o capacidad de desarrollo.

En biotecnología reproductiva, se considera de particular interés el estudio de denominado **secretoma**, que constituye el conjunto de proteínas producidas por el ovocito/embrión y secretados al medio que los circundan.

La caracterización del secretoma expandiría nuestro conocimiento sobre procesos celulares como el complejo diálogo entre estas estructuras y el ambiente materno, así como definir y predecir aquellos que demuestren mejor capacidad de desarrollo.

1.14 CALIFICACION DE EMBRIONES EN VIVO

1.14.1 CLASIFICACION SEGUN SU ESTADO CELULAR

Cuando las células comienzan a adherirse entre ellas y comienzan a perder su forma esférica el embrión recibe el nombre de **mórula**. La zona pelúcida se observa como una estructura transparente que rodea a las células.

Entre la zona pelúcida y las células existe un espacio llamado **espacio perivitelino**. Este espacio perivitelino es identificable hasta que el embrión se encuentra en estado de **blastocisto** (Serrano, 2009). (Figura 22)

Figura 22: 1. Zona pelúcida; 2. Masa celular; 3. Espacio perivitelino.



Fuente: (Serrano, 2009)

Los estados de desarrollo del embrión se identifican, después de tener 16 células, de acuerdo al desarrollo morfológico. (Serrano, 2009)

Mórula (Estadio 4): Las células (blastómeras) son difíciles de distinguir unas de otras. El embrión tiene aproximadamente 5 días.

Mórula compacta: Las blastómeras se juntan y forman una masa celular sólida. El embrión ocupa aproximadamente un 60% del espacio perivitelino. (Figura 23)

Figura 23: Mórula (Estadio 4)



Fuente: (Serrano, 2009)

Blastocisto temprano (Estadio 5): Presenta una cavidad en donde se encuentra un fluido llamado **blastocele**.

El embrión ocupa el 70-80% del espacio perivitelino. Se puede diferenciar el trofoblasto y el macizo celular interno. Luego de esta etapa viene el **Blastocisto** (Estadio 6) propiamente dicho.

La única diferencia entre estos dos estados es básicamente el tamaño de la cavidad. (Figura 24)

Figura 24: Blastocisto, nótese la cavidad y el fluido (1).



Fuente: (Serrano, 2009)

Blastocisto expandido (Estadio 7): El diámetro aumenta hasta en un 150%. La zona pelúcida se adelgaza hasta un 66% con respecto al grosor que tenía en el Estado 4. Estos embriones tienen una edad estimada de 8 a 9 días. (Figura 25)

Figura 25: Adelgazamiento de la zona pelúcida



Fuente: (Serrano, 2009)

Blastocisto eclosionado (Estadio 8): La masa celular puede estar por fuera de la zona pelúcida o en proceso de salir. Luego viene un estado llamado **Blastocisto eclosionado expandido** (Estadio 9).

El grado de desarrollo de un embrión se determina por números en donde el número 1 identifica un oocito sin fertilizar, el número 2 nos identifica un embrión con hasta 16 células (2 a 5 días).

El número 3 identifica una mórula temprana y los números del 4 al 9 nos identifican embriones que ya presentaron compactación. En un lavado convencional los embriones son colectados entre los días 6 y 8, o sea entre mórula y blastocisto.

En resumen los estadios del embrión son los siguientes (Serrano, 2009): (Figura 26 y 27)

Estado 1: Infertilizado

Estado 2: de 2 a 16 células

Estado 3: Mórula temprana

Estado 4: Mórula

Estado 5: Blastocisto temprano

Estado 6: Blastocisto

Estado 7: Blastocisto expandido

Estado 8: Blastocisto eclosionado

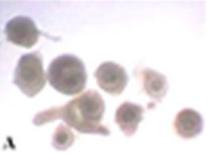
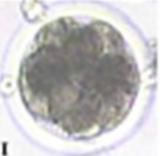
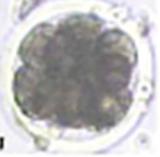
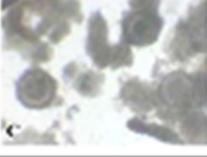
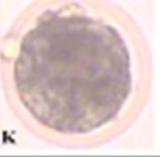
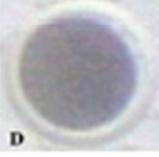
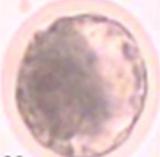
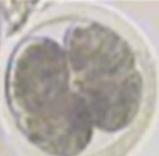
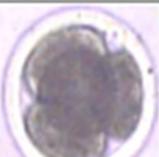
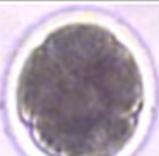
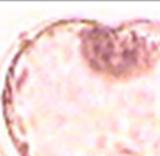
Estado 9: Blastocisto eclosionado en
expansión

Figura 26: 1. Mórula compacta; 2. Infertilizados; 3. Mórulas tempranas; 4. Infertilizado.



Fuente: (Serrano, 2009)

Figura 27: Clasificación de acuerdo al número de células.

Día de la PIV	Etapa	Foto	Día de la PIV	Etapa	Foto
-1	A) Ovocitos inmaduros		3	I) Embrión de 8 a 16 células	
0	B) Ovocitos maduros		3 a 4	J) Embrión > 16 células	
0	C) Ovocitos fertilizados		4 a 6	K) Morula compacta	
0 a 1	D) Embrión de 1 célula		5 a 7	L) Morula compacta/ blastocisto temprano	
1	E) Embrión de 2 células		6-8	M) Blastocisto	
1 a 2	F) Embrión de 2 células segmentándose		7-9	N) Blastocisto expandido	
2	G) Embrión de 4 células		8-9	O) Blastocisto extruido	
2 a 3	H) Embrión de 8 células		8-9	P) Blastocisto extruido	

Fuente: Rivera, 2000

1.14.2 CALIFICACION DE ACUERDO A SU CALIDAD

La evaluación la damos de acuerdo a sus características morfológicas. Estas características son subjetivas y pueden variar de un técnico a otro. Las características que debemos tener en cuenta para calificar un embrión son (Serrano, 2009):

- Forma del embrión
- Color y textura de la masa celular
- Diferencia de tamaño entre las blastómeras
- Número y nivel de compactación de las blastómeras
- Tamaño del espacio perivitelino
- Presencia de blastómeras sueltas o separadas
- Presencia o ausencia de vesículas
- Forma y estado de la zona pelúcida

En la calificación vamos a utilizar una escala numérica que va del 1 al 4 (Serrano, 2009):

Calidad 1: Embriones excelentes y buenos. Son embriones esféricos, simétricos con células de tamaño, color y texturas uniformes. Puede haber pequeñas imperfecciones como algunas blastómeras sueltas, tamaño irregular o algunas vesículas. Estos embriones son los ideales para congelar.

Calidad 2: Embriones regulares. Tienen problemas más definidos incluyendo blastómeras sueltas, vesículas o células degeneradas. Estos embriones pueden ser congelados pero se obtendrán resultados bajos. Sin embargo son embriones aceptables para ser transferidos en fresco (de donadora a receptora directamente sin congelación).

Calidad 3: Embriones malos. Numerosas blastómeras sueltas, células degeneradas. Células de distinto tamaño, color y textura, formas irregulares.

Numerosas vesículas. No se deben congelar y al ser transferidos en fresco nos dan resultados pobres.

Calidad 4: Muertos o degenerados. Son embriones cuyas blastómeras se encuentran en desorden y sueltas. Hay muchas vesículas. Puede tener un aspecto granular como los infertilizados y tener un crecimiento retardado con respecto a los otros embriones de la colecta. No se congelan ni se transfieren en fresco.

1.15 CRIOPRESERVACION DE EMBRIONES BOVINOS

Actualmente, los métodos más utilizados para crio preservar embriones son la congelación convencional y la vitrificación. La primera es considerada la técnica de elección para la crio preservación de embriones bovinos producidos in vivo.

En este tipo de embriones, la congelación convencional ha permitido obtener resultados ligeramente inferiores a los registrados con embriones en fresco (Lidner y Wright, 1983). Al mismo tiempo, la introducción del etilenglicol como crio protector permitió desarrollar la técnica de transferencia directa de embriones congelados/descongelados (procedimiento similar a la inseminación artificial), posibilitando la aplicación de esta técnica en condiciones de campo, sin necesidad de remover el o los crio protectores utilizados (Voekel y Hu, 1992).

Durante el procedimiento de congelación, las células embrionarias sufren cambios importantes asociados a la formación de hielo intra o extracelular que pueden disminuir la sobrevivencia poscriopreservación. Para poder minimizar estos problemas, se ha recurrido al uso de "sustancias crio protectoras", así como a tasas de descenso térmico controladas mediante la utilización de máquinas congeladoras programables de alto costo.

El proceso de vitrificación fue investigado por primera vez por Tammann en 1898, pero Luyet, 60 años más tarde, reconoció el potencial de alcanzar un estado libre de hielo durante la crio preservación. En 1985, Rali y Fahy introdujeron la técnica de vitrificación en la conservación de embriones, la cual presenta algunas ventajas importantes respecto a la congelación convencional, como son: no hay

formación de cristales de hielo, mayor rapidez en el procesamiento de cada muestra, y menor costo, por prescindir de máquinas congeladoras programables. Debido a esto, la vitrificación constituye una herramienta interesante capaz de reemplazar a la congelación convencional, especialmente cuando se intenta conservar embriones sensibles a la criopreservación, como son los producidos in vitro (Leibo y Loskutoff, 1993; Pollard y Leibo, 1994).

1.15.1 DESCRIPCION DEL PROCESO DE CRIOPRESERVACION DE LAS SOLUCIONES ACUOSAS

1.15.2 CONGELACION

Para que un líquido cristalice se requiere la presencia de "núcleos" sobre los cuales la fase líquida pueda condensarse. En el agua pura, grupos de moléculas unidas por puente de hidrógeno actúan como núcleos de cristalización (nucleación homogénea), aunque otras sustancias (proteínas, minerales, etc.) también pueden actuar como núcleos (nucleación heterogénea) (Zachariassen y Kristiansen, 2000). De este modo, la formación de cristales se lleva a cabo mediante un proceso de "desarrollo" de núcleos seguido por uno de agregación de moléculas de agua desde la fase líquida a la sólida en una zona de interface, denominado "crecimiento".

El proceso de congelación podría resumirse mencionando que a medida que una solución acuosa se enfría por debajo de 0° C disminuye el movimiento molecular, sobre enfriándose hasta alcanzar una masa crítica de núcleos, momento en el cual se libera el calor latente de cambio de estado (Akyurt et al, 2002).

Uno de los efectos de la cristalización en las soluciones acuosas es remover agua de la solución, ya que los cristales que se forman están compuestos por agua pura, por lo cual la solución remanente, que permanece sobre enfriada, se concentra. De este modo, esta nueva solución permanece líquida hasta que se alcanza, mediante una mayor extracción de calor, el nuevo punto de equilibrio de congelamiento.

Este proceso se repite hasta que a una determinada temperatura, denominada eutéctica o "punto eutéctico", la fase líquida remanente y los solutos solidifican (Vita y Carretero, 1985; Akyurt et al., 2002).

1.15.3 VITRIFICACION

El estado vítreo, es aquel alcanzado por el rápido enfriamiento de un medio líquido en ausencia de cristales de hielo y con una elevada viscosidad (Rail y Fahy, 1985). Esta solución adquiere un aspecto amorfo similar al vidrio, del cual toma su denominación.

Los factores que afectan la probabilidad de vitrificación de una solución son la viscosidad inicial, su volumen y la tasa de enfriamiento a la cual es sometida (Arav et al., 2002), Según Wolfe y Bryant (1999), la adición de distintos solutos disminuye la probabilidad de nucleación y crecimiento de los cristales de hielo por dos razones:

1. al aumentar la viscosidad, se retrasa el reordenamiento de las moléculas de agua para formar el cristal de hielo, dificultándose de este modo los procesos de nucleación y crecimiento.
2. debido a que los solutos son incompatibles con la estructura del hielo, por carecer de una cantidad determinada de agua pura, se torna difícil que los núcleos alcancen el tamaño crítico.

Durante el proceso de vitrificación, el rápido enfriamiento disminuye bruscamente el movimiento molecular, de modo que las moléculas de agua no tienen el tiempo suficiente para ordenarse y orientarse, de acuerdo a sus cargas, para formar los cristales de hielo. Por esta razón las soluciones vitrificadas mantienen la distribución iónica y molecular de un líquido pero en un estado sobre enfriado y extremadamente viscoso, con un aspecto brillante y transparente que lo diferencia del cristalino el cual es opaco y sin brillo.

La desvitrificación, corresponde a la cristalización que se produce en un sistema previamente vitrificado. Este proceso se lleva a cabo debido a que durante el calentamiento se atraviesa nuevamente la temperatura óptima para que se

establezca la nucleación, la cual es más baja que la requerida para el crecimiento de los cristales de hielo. Por tal motivo, cuando se revierte el estado vítreo, se utiliza el término calentamiento y no desvitrificación.

Durante la vitrificación no se establece un verdadero cambio de fase, por lo cual no se produce liberación de calor latente ni cristales de hielo, los cuales constituyen aspectos muy importantes para su aplicación en la preservación de estructuras biológicas

1.15.4 CONGELACION DE EMBRIONES

Según Massip et al. (1987) y Niemann (1991), los pasos generales durante el proceso de congelación-descongelación de embriones pueden resumirse de la siguiente manera:

1.15.4.1 EXPOSICION DE LOS EMBRIONES A LAS SOLUCIONES DE CONGELACION.

Los embriones son congelados generalmente en una solución salina tamponada fosfato (PBS) suplementaria con proteínas o macromoléculas (suero bovino, albúmina bovina (BSA)), a la cual se le adiciona sustancias denominadas crio protectoras, que modifican el comportamiento físico de la solución y protegen a las células de los daños asociados al descenso térmico.

Estas sustancias pueden penetrar o no la membrana plasmática de las células embrionarias (crio protectores penetrantes y no penetrantes, respectivamente), y en esta metodología se utilizan en concentraciones que no superan 2 Molar (M).

Los agentes penetrantes pueden reemplazar el agua intracelular antes del enfriamiento, lo cual en combinación con una tasa de descenso térmico lenta y controlada, reducirían los cambios de volumen celular y minimizarían la cristalización intracelular (Palasz y Mapletoft, 1996).

Los crio protectores no penetrantes ejercen su acción a través de un aumento en la osmolaridad de las soluciones de crio preservación, promoviendo la deshidratación

celular y disminuyendo entonces la formación y el tamaño de los cristales de hielo (Massip, Van der Zwaimen y Ectors, 1987).

En los últimos años, se ha intentado eliminar las macromoléculas de origen animal de las soluciones de criopreservación, reemplazándolas por alcohol polivinílico o hialuronato de sodio (Seidel, Elsdén y Brink, 1990; Joly, Nibart y Thibier, 1992; Sommerfeld y Niemann, 1999), con el fin de prevenir problemas sanitarios y favorecer el comercio de embriones así conservados (Massip, 2001). Sin embargo, los resultados no han sido muy alentadores por lo cual es necesario seguir investigando el impacto de estos elementos sobre la sobrevivencia poscriopreservación.

1.15.4.2 ENVASADO DE LOS EMBRIONES

Actualmente el elemento más utilizado para contener los embriones, tanto para la criopreservación como para su transporte y/o transferencia a una hembra receptora, lo constituye la pajuela de plástico de 0,25 ml de capacidad.

Existen diversos modos de cargar las pajuelas, pero en la mayoría, el o los embriones se encuentran contenidos en una columna de 0,5 a 2 centímetros de solución de congelación separado de otras columnas, ya sean de PBS con suero o soluciones con sacarosa como en el método One-Step (Leibo, 1984) (descrito más adelante), separadas por burbujas de aire. En general, las pajuelas una vez cargadas son selladas en su extremo abierto con alcohol polivinílico.

1.15.4.2.1 ENFRIAMIENTO INICIAL.

Se efectúa mediante la introducción de los embriones envasados en la cámara de una máquina congeladora programable. Así, la muestra se enfría desde la temperatura de equilibrio hasta alrededor de -7 °C.

1.15.4.2.2 INDUCCION DE LA CRISTALIZACION O "SEEDING".

Esto se efectúa luego de 5-7 minutos de introducidas las pajuelas en la crio cámara, tocando el extremo de las pajuelas con un elemento metálico enfriado en N₂ líquido. Con este procedimiento se evita un sobre enfriamiento excesivo de la solución y por lo tanto, se reduce el cambio de temperatura producido por la liberación del calor latente de cambio de estado.

1.15.4.2.3 DESCENSO TERMICO LENTO Y CONTROLADO.

El descenso térmico se efectúa utilizando máquinas congeladoras programables, desde la temperatura en la cual se induce el "seeding" hasta -30 a -40 °C según lo descrito por Willadsen (1977), y a tasas comprendidas entre -0,3 y -0,5 °C/minuto. De este modo se logra una deshidratación celular suficiente como para minimizar la cristalización intracelular (Lehn-Jensen y Rail, 1983).

1.15.4.2.4 DESCENSO TERMICO RAPIDO.

Alcanzada la temperatura de -30 a -40 °C las pajuelas se introducen directamente en N₂ líquido. De este modo se alcanza, junto con el descenso térmico lento, una formación controlada de cristales de hielo en la solución de congelación, determinando finalmente la vitrificación del embrión y del medio que inmediatamente lo rodea (Rail, Reid y Polge, 1984; Rail y Fahy, 1985; Kasai, 1996).

1.15.4.2.5 ALMACENAMIENTO EN N₂ LIQUIDO.

Se efectúa en contenedores. (termos) de N₂ líquido a -196 °C.

1.15.4.2.6 DESCONGELACION.

Este procedimiento debe efectuarse de manera rápida para impedir el crecimiento de los cristales de hielo desarrollados durante la congelación (Lehn-Jensen y Rail, 1983; Mazur, 1984). Rail y Polge (1984), indicaron que un descongelamiento lento otorga el tiempo suficiente como para permitir la desvitrificación extra e intracitoplásmica lo que puede conducir a una baja sobrevivencia poscriopreservación. Para la descongelación, las pajuelas son retiradas del N₂ líquido e introducidas en un baño maría a 30 °C aproximadamente.

1.15.4.3 EXTRACCION DE LOS CRIOPROTECTORES.

Luego de la congelación-descongelación, la mayoría de los agentes crioprotectores deben ser extraídos de los embriones antes de ser transferidos a hembras receptoras o colocados en cultivo. Esto debe efectuarse porque si al momento de la descongelación, las células cargadas de crioprotectores son expuestas, por ejemplo, a una solución de PBS isosmolar respecto de las células en condiciones normales o al tracto reproductor femenino, debido a que el agua difunde más rápido que estos compuestos a través de la membrana plasmática, las células se desintegrarían por el shock osmótico.

Por este motivo, se recurre a la rehidratación del embrión mediante pasajes a través de concentraciones y osmolaridades decrecientes del crioprotector utilizado. Otra alternativa es emplear sustancias no penetrantes como la sacarosa (buffer osmótico) cuya osmolaridad sea igual o ligeramente inferior a la alcanzada con el crioprotector penetrante utilizado, lo cual disminuye la entrada de agua mientras se produce la salida del crioprotector penetrante. En 1984, Leibo desarrolló el método One-Step en el cual la extracción del crioprotector (Glicerol 1,5 M) se efectúa dentro de la misma pajueta de transferencia.

En ésta se carga una columna de sacarosa iso-osmolar al medio de congelación y luego de la descongelación, la pajueta se agita para que se mezclen las soluciones, se mantiene la misma durante 5-20 minutos a 20-37 °C, y se efectúa la transferencia.

Una variante a este sistema fue la desarrollada por Massip y Van der Zwalmen (1984) quienes obtuvieron buenos resultados cuando los embriones fueron equilibrados y congelados en una mezcla de glicerol (Gl) 1,36 M + sacarosa 0,25 M en PBS y una vez descongelados fueron transferidos directamente a las hembras receptoras sin necesidad de remover los crio protectores.

Posteriormente Voelkel y Hu (1992ab), obtuvieron resultados similares reemplazando el Gl por el etilenglicol (EG) (crio protector penetrante de muy bajo peso molecular que difunde a través de la membrana plasmática rápidamente).

En esta metodología la remoción del crio protector se efectúa en el ambiente uterino, posibilitando la transferencia directa de los embriones luego de ser descongelados sin necesidad de efectuar ningún otro procedimiento.

1.16 VITRIFICACION DE EMBRIONES

Las características generales de la vitrificación de embriones son las siguientes:

- Descenso ultrarrápido de la temperatura.
- Utilización de crio protectores en altas concentraciones.
- Muestra vehiculizada en un pequeño volumen de solución, lo cual posibilita aumentar a tasa de descenso térmico y/o disminuir la concentración de crio protectores.

1.16.1 EXPOSICION DE LOS EMBRIONES A LAS SOLUCIONES DE VITRIFICACION.

Las soluciones de vitrificación están formuladas con una combinación de crio protectores (penetrantes y no penetrantes), un soporte líquido (PBS o medios más

enriquecidos como el Tissue Culture Medium (TCM-199), y macromoléculas (suero, BSA, etc.).

Estas soluciones se caracterizan por contener altas concentraciones de agentes crioprotectores (5 a 7 M) (Rail y Fahy, 1985; Mahmoudzadeh et al., 1995; Vajta, 2000). Al igual que en las soluciones de congelación, en los últimos años también se ha puesto énfasis en evitar la utilización de suero en la formulación final de las soluciones de vitrificación.

De este modo, se han obtenido resultados interesantes utilizando BSA (Chiewe et al., 1991), o alcohol polivinílico (Naitana et al., 1997; Leoni et al., 2002; Walker y Seidel, 2005).

Con este propósito, también se han utilizado exitosamente ciertas proteínas anticongelantes de peces en las soluciones de vitrificación en embriones bovinos y ovinos (Arav et al., 1994), así como de origen vegetal (Palasz, del Campo y Mapletoft, 1997; Palasz et al., 1997). Aunque estos resultados han sido prometedores, los mismos aparecen como contradictorios y serán necesarias más investigaciones en este sentido.

1.16.2 ENVASADO DE LOS EMBRIONES EN RECIPIENTES APROPIADOS Y EN PEQUEÑOS VOLUMENES.

En la mayoría de los trabajos publicados se han utilizado con éxito las pajuelas de 0,25 ml de capacidad. Sin embargo, en búsqueda de la conservación de ovocitos y embriones en pequeños volúmenes, se han utilizado exitosamente grillas de microscopía electrónica (Martino, Songsasen y Leibo, 1996), pajuelas de 0,25 ml abiertas y estiradas (Open Pulled Straw (OPS), Vajta, 1998), espirales de nylon (cryoloops) (Lañe et al., 1999ab; Oberstein et al., 2000) y capilares de vidrio (Kong et al., 1999; Cho et al., 2002b). También se ha descrito la vitrificación de ovocitos (Papis, Shimizu e Isaïke, 1997) y embriones (Misumi et al., 2003) descargando estas estructuras suspendidas en una gota de solución de

vitrificación directamente en N₂ líquido, sin usar ninguno de los elementos de contención descriptos anteriormente.

1.16.3 DESCENSO ULTRARRAPIDO DE LA TEMPERATURA (VITRIFICACIÓN).

Este procedimiento puede llevarse a cabo, dependiendo del protocolo adoptado, en un solo paso introduciendo el soporte del embrión directamente en N₂ líquido, o en dos pasos, enfriándolo previamente durante un corto tiempo en los vapores del mismo. La introducción de las pajuelas de 0,25 ml conteniendo soluciones de vitrificación en N₂ líquido permite alcanzar tasas de descenso térmico del orden de los 2.500° C/minuto (Palasz y Mapletoft, 1996), mientras que Vajta et al. (1998) con OPS determinaron tasas de 22.500° C/minuto entre -25 y -175° C y de 16.700° e/minuto entre 0 y -195° C. Arav et al. (1998) diseñaron un dispositivo (VTT-MASTER®, IMT, Israel) mediante el cual la temperatura del N₂ líquido es reducida hasta -210° C aplicando presión negativa.

Esto permite aumentar la tasa de descenso térmico principalmente en la parte inicial del enfriamiento (desde 20 hasta -10° C) siendo, seis, cuatro o dos veces mayor que utilizando pajuelas de 0,25 ml, OPS o grillas de microscopía electrónica, respectivamente. Por debajo de -10° C, la tasa de descenso térmico se duplica independientemente del soporte utilizado para conservar los embriones (Arav et al., 2002).

1.16.4 CALENTAMIENTO RAPIDO DE LOS EMBRIONES HASTA TEMPERATURAS FISIOLÓGICAS.

El agua vitrificada mantiene la misma distribución iónica y molecular que en estado líquido, por lo cual, si al calentar la muestra el movimiento molecular no se recupera rápidamente, existe el riesgo que se establezcan los procesos de nucleación homogénea o heterogénea, así como de crecimiento a partir de pequeños núcleos formados durante la vitrificación (Wowk et al., 2000).

Por este motivo, durante el calentamiento, se necesita alcanzar altas tasas de ascenso térmico. Rail y Fahy (1985) observaron que los mayores porcentajes de sobrevida embrionaria se obtuvieron cuando el calentamiento se efectuó de modo rápido (2500° C/minuto). En la práctica, estas tasas se logran introduciendo la pajueta en un baño maría a 20° C (Massip et al., 1987; Massip et al., 1989; Valdez et al., 1990; Kasai et al., 1990; Ishimori et al., 1992; Saito et al., 1994), o a temperaturas comprendidas entre los 30 y 39° C durante pocos segundos (Saha et al., 1996; Kat'di et al., 1999; Mtango et al., 2001; Leoni et al., 2002).

1.16.5 EXTRACCION DE LOS CRIO PROTECTORES.

Una vez calentadas las pajuelas, los crío protectores penetrantes deben ser retirados de los embriones, e inmediatamente, éstos deben rehidratarse.

Por ello, se debe utilizar un buffer osmótico, en una concentración suficiente para alcanzar una osmolaridad ligeramente inferior a la de la solución de vitrificación. Este buffer (sacarosa), puede o no estar contenido en la misma pajueta. Massip et al. (1987) utilizaron una pajueta con una de las columnas de medio con sacarosa 1 M. Al descargar el contenido de la pajueta en una placa, la sacarosa previno el rápido influjo de agua al embrión y la muerte celular. A diferencia de esto, Kuwayama et al. (1992) propusieron descargar el contenido de las pajuelas en una placa con una solución de TCM 199 + 1 M de sacarosa a 15° C, ya que las mismas no contenían ninguna columna con sacarosa. En ambos experimentos, se obtuvieron aceptables tasas de sobrevida embrionaria.

Vajta et al. (1995; 1996a; 1999b), perfeccionaron un sistema parecido al One Step denominado "dilución en pajueta", en el cual una vez calentados, los embriones son mezclados con el medio de dilución (extracción del crioprotector) dentro de la pajueta y mantenidos en ella hasta 30 minutos. Saha et al. (1996) utilizaron una solución de vitrificación compuesta por 40% EG, 11,3% trehalosa y 20% polivilpirrolidona y obtuvieron un 60% de parición transfiriendo directamente el contenido de las pajuelas en receptoras sin remover los crío protectores en ningún momento.

En la metodología OPS (Vajta et al., 1998), las pajuelas se retiran del N₂ líquido e inmediatamente, el extremo que contiene los embriones, se introduce dentro de una solución compuesta por 0,25 M de sacarosa + 20 % de suero en TCM 199 durante 3 minutos. Trascorrido este tiempo, los embriones son colocados en una solución con 0,15 M de sacarosa durante 1 minuto. Todos los pasos descritos se efectúan sobre platina térmica a 37° C. Una variante a esta metodología fue introducida un año más tarde por Vajta et al. (1999b), en la cual el extremo delgado de las pajuelas es introducido en una pajuela de 0,5 ml que contiene una solución con 0,2 M de sacarosa. Con este sistema, el calentamiento y la dilución en la pajuela posibilitarían la transferencia de los embriones sin necesidad de trabajar bajo lupa.

1.17 SOBREVIDA EMBRIONARIA POSCRIOPRESERVACION EVALUADA IN VITRO

La sobrevida embrionaria poscriopreservación puede ser evaluada in vivo mediante su transferencia a hembras receptoras previamente sincronizadas, o mediante su cultivo in vitro. Dentro de esta última metodología, se pueden tener en cuenta variables tales como la expansión del blastocele y/o la protrusión (eclosión) fuera de la zona pelúcida; la fijación a una capa de células en cocultivo (Dinnyés et al., 1996), las alteraciones celulares (muerte celular o lesiones de membrana), el número de células embrionarias totales (Kaidi et al., 1999, Martínez et al, 2002), la morfología y el metabolismo (Kaidi et al., 2001; Leoni et al., 2002), entre otras.

1.18 EFECTO DEL DESCENSO TERMICO SOBRE LAS ESTRUCTURAS CELULARES.

1.18.1 CRIOINJURIAS.

En la actualidad ningún protocolo de congelación o vitrificación disponible garantiza la total integridad de las estructuras así preservadas. Según Dobrinsky (1996), no importa "cómo" los embriones sean crio preservados, "siempre alguno muere".

Durante la crio preservación, los embriones están expuestos a diversos tipos de injurias, las cuales son difíciles de considerar por separado ya que en muchos casos operan en conjunto.

1.18.2 FORMACION DE HIELO INTRA O EXTRACELULAR.

Durante el proceso de crio preservación, la formación de hielo intracelular puede deberse a tasas de descenso térmico muy altas. Por ello el agua endocelular no tiene tiempo suficiente para alcanzar el medio extracelular, se sobre enfría, alcanza la temperatura de nucleación y finalmente se cristaliza dentro del citoplasma. Por otra parte, si la tasa de ascenso térmico durante la descongelación o calentamiento no es lo suficientemente rápida, es posible que se produzca hielo intracelular como consecuencia de un nuevo pasaje a través de la temperatura de nucleación, o por crecimiento de los pequeños cristales que pudieran haberse generado durante el enfriamiento. Esto puede producirse además, por un desequilibrio entre la concentración del crioprotector y la tasa de descenso térmico (Kasai et al., 2002).

Acker y McGann (1998) concluyeron que la propagación de cristales de hielo entre células adyacentes se establece mediante un proceso denominado "nucleación catalizada por superficie", Esto contrasta con la teoría de Berger y Uhrík (1996) e Irimia y Karisson (2002), quienes sostienen que el hielo intracelular se propaga a través de uniones intercelulares tipo gap. Sin embargo, otros autores sostienen que durante la criopreservación se generarían fuerzas suficientes como para producir pequeñas lesiones en la membrana plasmática por donde se propagaría el hielo (Muldrew y McGann, 1994).

Actualmente, la utilización de modernas máquinas congeladoras programables y la combinación de distintos crioprotectores, determinan que sea poco habitual la lesión embrionaria por hielo extracelular. Con el fin de caracterizar la apariencia morfológica de los embriones afectados por este tipo de injuria, Kasai et al. (2002) lograron reproducir este proceso colocando embriones de ratón a $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descendiendo la temperatura a $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, en ausencia de crioprotector. Cuando los embriones fueron colocados en PBS, observaron deformación de la zona pelúcida y un marcado aumento del tamaño de las células embrionarias.

1.18.3 AUMENTO O DISMINUCION EXCESIVA DE VOLUMEN CELULAR POR EFECTO OSMOTICO.

La adición o extracción de las sustancias crio protectoras, así como el propio proceso de congelación (efecto de solución), producen cambios de volumen en las células embrionarias que, dependiendo de su magnitud, pueden afectar su sobrevivida poscriopreservación. La disminución del volumen celular por una pérdida importante de agua puede determinar modificaciones en la composición del medio intracitoplásmico (Karow 2001).

En este caso, los solutos altamente concentrados podrían precipitar o afectar la conformación proteica y consecuentemente su función metabólica. Por otro lado, la deshidratación favorecería la pérdida de ubicación normal de las estructuras citoplásmicas, aproximándose lo suficiente como para permitir reacciones intermoleculares como uniones entre grupos sulfidrilos libres de tipo irreversible.

Con respecto al aumento excesivo de volumen, pareciera ser crítico el manejo de los embriones inmediatamente después de la descongelación o el calentamiento. La alta concentración de crio protectores intracelulares puede determinar que las células embrionarias incorporen agua y aumenten excesivamente de volumen, pudiendo dañar estructuras internas o bien desintegrarse por completo.

1.18.4 EFECTO TOXICO DE LOS CRIOPROTECTORES.

El cito esqueleto constituye una compleja red de filamentos proteicos, extendidos a través del citoplasma, que coordinan la organización y el movimiento intracitoplásmico (Dobrinsky, 1996). Sin embargo, los elementos que lo constituyen presentan un comportamiento inestable, en donde las subunidades que lo componen se encuentran en constante recambio (Bretscher, 2000).

Aunque los crioprotectores son necesarios para minimizar los daños que puedan ocurrir durante la criopreservación, según Dobrinsky (1996) estos compuestos pueden también tener efectos nocivos sobre los embriones por toxicidad química. Este autor sostiene que el daño se produciría por una alteración en la organización de los filamentos que componen el citoesqueleto, que culminaría con una despolimerización de los mismos.

Otras alteraciones asociadas con la adición de sustancias crioprotectoras son el aumento del espacio perivitelino, el aumento de tamaño mitocondrial y la presencia de vacuolas dentro de las mismas, así como la aparición de signos de degeneración nuclear (Fair et al, 2001). Además, el glicerol podría inhibir el sistema $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$, el cual es fundamental para el mantenimiento del gradiente osmótico celular (Barnet, 1978).

1.18.5 ALTERACIONES DE LAS MEMBRANAS CELULARES.

Las membranas celulares (plasmática y de organelas) son adversamente afectadas por efecto osmótico durante los procesos de criopreservación y su lesión constituye uno de los indicadores más importantes de muerte celular (Gardner, 1999; Wolfe y Bryant; 1999; Karow, 2001). Cuando el contenido de agua intracelular disminuye por debajo de 10-20%, los componentes celulares permanecen muy juntos entre sí, pudiendo determinar que las membranas pasen de un estado gel de tipo laminar, a uno hexagonal de fase II (Wolfe y Bryant, 1999), aunque este proceso también puede producirse por efecto directo del frío (Petit y Edidin, 1974).

En este estado, formado por pequeños cilindros de agua rodeados por fosfolípidos, las membranas celulares pierden la capacidad para llevar a cabo la mayoría de sus funciones. Otra causa por la cual las membranas pueden ser dañadas la constituye la formación de hielo intracelular (Acker y McGann, 2001).

1.18.6 FRACTURA EMBRIONARIA O DE LA ZONA PELUCIDA.

Este tipo de lesiones, probablemente se produzcan debido a diferencias en la expansión de los cristales de hielo (Lehn-Jensen y Rali, 1983) lo cual generaría cambios irregulares de volumen en los medios de crío preservación durante un rápido cambio de fase (Rail y Meyer, 1989). Según Kasai et al. (1996) durante la congelación convencional más del 50% de los embriones pueden ser físicamente dañados si las tasas de descenso-ascenso térmico durante la congelación-descongelación no son adecuadamente ajustadas. La utilización de elementos flexibles (pajuelas plásticas) para contener los embriones durante la crío preservación permite amortiguar los cambios de volumen de la solución. Durante la vitrificación-calentamiento, al no producirse cambios de fase, la incidencia de este tipo de críoinjuria es menor (Kasai, 1996). Estajesión es más frecuente durante el calentamiento, y se produciría por el rápido pasaje a través de la temperatura en la cual se forma la fase vítrea (-110 a -135°C).

Otras críoinjurias. Si bien los mecanismos descritos están bien documentados, estos podrían no ser los únicos por los cuales se produciría daño celular. Morris (2000) menciona que durante la congelación, los embriones rara vez toman contacto directo con los cristales de hielo, permaneciendo en la fracción no congelada, donde son expuestos a diversos tipos de estrés físico, tales como:

- ✓ Daño mecánico como consecuencia de la formación de burbujas debido a un aumento de gas soluble.
- ✓ Alteración en los procesos de difusión y osmosis, producto de un aumento de la viscosidad.
- ✓ Desnaturalización proteica, debido a cambios de pH.

1.19 RESPUESTA CELULAR ANTE LAS CRIOINJURIAS

La crio preservación representa un desafío para las estructuras biológicas, lo cual puede generar distintos tipos de respuesta celular, ya sea a nivel estructural, ultra estructural o metabólico, determinando en muchos casos la muerte celular.

1.19.1 CAMBIOS ESTRUCTURALES Y ULTRA ESTRUCTURALES RELACIONADOS CON LA CRIO PRESERVACION.

Hyttel, Lehn-Jensen y Greve (1986) demostraron que la crio preservación estaba asociada con alteraciones morfológicas. Estos autores pudieron observar daños en la zona pelúcida, irregularidades en el ordenamiento espacial de las células embrionarias, restos celulares en el espacio peri vitelino y defectos a nivel citoplásmico que daban el aspecto de espacios vacíos.

Según Fair et al. (2001), los blastocistos bovinos obtenidos in vivo se caracterizan ultra estructuralmente por presentar un espacio perivitelino estrecho, células trofoectodérmicas con gran cantidad de micro vellosidades orientadas hacia la zona pelúcida, gotas lipídicas pequeñas, sistemas de unión celular bien definidos y una gran cantidad de mitocondrias redondeadas o alargadas con numerosas crestas transversales.

Estos autores observaron que luego de la congelación-descongelación, los embriones presentaron un agrandamiento del espacio perivitelino, disminución del tamaño celular, daños en las microvellosidades y presencia de detritus celulares y gotas lipídicas en el espacio perivitelino.

En cambio, en los embriones bovinos producidos in vitro, observaron una mayor cantidad de gotas lipídicas, micro vellosidades más esparcidas, mitocondrias de aspecto redondeado con crestas transversales o periféricas, o alargadas con crestas transversales, presencia de núcleos con signos de degeneración, detritus celulares en el espacio perivitelino e inclusive en el blastocele.

Poscriopreservación, la mayoría de estos embriones perdieron su aspecto circular, fue imposible distinguir morfológicamente las células trofoblásticas de las pertenecientes a la masa celular interna así como las uniones celulares y los organelos, y fue posible observar gotas lipídicas y severas alteraciones en la membrana plasmática.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ohboshi et al. (1998), quienes pudieron observar pérdida de micro vellosidades, ruptura de la membrana plasmática y aumento del volumen mitocondrial y del retículo endoplásmico, siendo estos cambios más pronunciados en los embriones que habían sido equilibrados con los crioprotectores en un solo paso.

Estos autores concluyeron que la criopreservación mediante vitrificación genera daños sobre las membranas celulares de los embriones bovinos, y que la naturaleza y la magnitud de los mismos dependen del tipo de protocolo utilizado.

Desde el punto de vista de la estructura del embrión, se ha observado que el recuento de células totales es menor luego de los procesos de congelación-descongelación y vitrificación-calentamiento, junto a la aparición de detritus celulares en el espacio perivitelino (Kaidi et al., 2000). Estos últimos, probablemente representen restos de células que colapsan durante los procesos de criopreservación mencionados.

1.19.2 CAMBIOS METABOLICOS ASOCIADOS A LA CRIOPRESERVACION

Se han informado cambios metabólicos importantes en embriones criopreservados producidos tanto *in vitro* como *in vivo*, observándose por lo general, una disminución en el consumo y utilización de los nutrientes. Luego de la congelación-descongelación, los embriones producidos *in vitro* reducen un 50% la producción de CO₂ a partir de glucosa y ésta disminución es particularmente marcada en los embriones de inferior calidad (Khurana y Niemann 2000). En los embriones producidos *in vivo*, no se encontraron diferencias, excepto en aquellos

de baja calidad (Khurana y Niemann, 2000; Gardner, Pawelczynski y Trounson, 1996).

De acuerdo con los hallazgos de Kaidi et al. (2001), quienes compararon la morfología y el metabolismo de blastocistos bovinos producidos in vitro, luego de ser congelados o vitrificados, el consumo de glucosa, piruvato y oxígeno disminuyó en los embriones sometidos a congelación pero no en los vitrificados.

Esto coincide con los resultados de Partridge et al. (1995) y Gardner et al. (1996), quienes encontraron un menor consumo de glucosa en embriones que sobrevivieron a la congelación. Según Uechi et al. (1997) esto se debería a una disminución, por efecto de la congelación, en la expresión del transportador de glucosa transmembrana GLUT 1. Kaidi et al. (2001) compararon el consumo de glucosa, piruvato y oxígeno entre embriones congelados y sin crio preservar y encontraron que en los primeros, este fue menor en todos los casos. Sin embargo, cuando el consumo de nutrientes fue expresado por célula embrionaria sobreviviente, no hallaron diferencias.

Otro cambio metabólico asociado con la crio preservación de embriones bovinos producidos in vitro lo constituye la disminución en la síntesis de ADN, independientemente del crio protector utilizado (Takagi, Sakonju y Susuki, 1996).

De acuerdo a lo descripto, los cambios metabólicos asociados a la crio preservación probablemente se relacionen con alteraciones ultra estructurales como las mencionadas previamente, lo cual modificaría las vías fisiológicas de metabolización de nutrientes pudiendo evidenciarse a través de una disminución en su consumo.

CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 LOCALIZACION

Este trabajo se realizó en el **Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.**

2.1.1 UBICACION DEL ENSAYO.

País	 Ecuador
Provincia	 Cotopaxi
Cantón	 Latacunga
Parroquia	Salache
Ubicación	 0°55'0"S 78°37'0"O-0.933, -78.616

2.1.2 CONDICION GEOGRAFICA

- Nubosidad promedio 7/8
- Altitud 2757 m.s.n.m.
- Humedad relativa 70%
- Clima Mesotérmico con invierno seco
- Temperatura promedio 13.5 grados centígrados anual
- Heliofania mensual 120 horas
- Velocidad del viento 2.5 m/s
- Viento dominante SE
- Pluviosidad 550 mm anuales

Fuente: Registro administrativo CEYPSA, 2013

2.2 MATERIALES

2.2.1 MATERIALES DE OFICINA

- Papelería y materiales
- Computadora
- Impresora
- Calculadora
- Memoria USB

2.2.2. MATERIALES DE CAMPO

- Cofia
- Overol
- Tijeras
- Botas
- Guantes quirúrgicos
- Termo de transporte

2.2.3. RECURSOS TECNOLOGICOS

- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Flash memory
- Internet

2.2.4. MATERIALES DE LABORATORIO

- Cajas petri grandes
- Cajas petri pequeñas
- Jeringas de 5ml
- Gorras desechables
- Tollas de absorbentes
- Guantes de látex
- Mascarillas
- Fundas Ziploc
- Bisturí # 22
- Agua destilada
- Desinfectantes y antisépticos
- Pipetas Pasteur
- Macropipeta
- Puntas desechables de macropipetas
- Micropipeta
- Puntas desechables de micropipetas
- Holding
- Medio de maduración
- Medio sof
- Medio de fertilización
- Medio de cultivo
- Aceite mineral
- Percoll
- Heparina
- Baño María
- Cámara de flujo laminar
- Pajuelas de 0.25
- Estereomicroscopio tempera
- Termo de nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido

- Tapones de pajuelas
- Tanque mezclado con 90 % de N, 5 % de O₂ y 5 % de CO₂

2.2.5. MATERIALES BIOLÓGICOS

- Ovarios de bovinos
- Semen congelado (pajuelas)

2.3 DISEÑO METODOLÓGICO

2.3.1 TIPO DE INVESTIGACION

- Investigación Descriptiva

Consiste en la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables para llegar a conocer las situaciones y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades, objetos y procesos.

Por lo cual se aplicó este tipo de investigación en el ensayo para el desarrollo del experimento usando las técnicas FIV y PIV, para su posterior aplicación en programas de mejora genética y en permitir el aprovechamiento de vacas de alto potencial que van a los centros de faenamiento.

2.3.2 METODOLOGIA NO EXPERIMENTAL

Se realiza sin manipular deliberadamente variables; es decir, es una investigación donde no hacemos variar intencionalmente las variables independientes. Aquí observamos fenómenos tal y como se dan en su contexto natural para luego analizarlos

2.3.3 UNIDADES EXPERIMENTALES

En el presente trabajo se emplearon doscientos veinte ovocitos obtenidos mediante la técnica de aspiración de los ovarios recolectados de los centros de faenamiento, para realizar la producción in vitro de embriones bovinos.

2.3.4 METODOS Y TECNICAS EMPLEADAS

- Método Inductivo Deductivo

El método inductivo consiste en exhibir la manera cómo los hechos particulares (variables) están conectados a un todo (leyes).

El método deductivo muestra cómo un principio general (ley), descansa en un grupo de hechos que son los que lo constituyen como un todo.

Ambas formas de inferencia alcanzan el mismo propósito aun cuando el punto de partida sea diferente.

Por lo que se aplicó este método para el estudio de la producción in vitro de embriones (PIV) ya que es una biotecnología reproductiva que representa una mejora notable de los recursos ganaderos al permitir conjugar diversos procesos y técnicas para la conservación y salvaguarda del alto potencial genético.

- La Observación

Es un proceso cuya función primera e inmediata es recoger información sobre el objeto que se toma en consideración. Esta recogida implica una actividad de codificación: la información bruta seleccionada se traduce mediante un código para ser transmitida a alguien.

Por medio del sistema de producción, en los que el observador confecciona él mismo su sistema de codificación.

Por lo que se aplicó en este ensayo en la fase experimental, produciendo resultados que serán una base para el desarrollo de futuras investigaciones en la cual se podría tomar como una referencia para seguir en el desarrollo de investigaciones relacionadas con el tema,

teniendo en cuenta los aspectos que se darán para cada una de las variables a investigar.

- **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizara porcentajes, tablas y gráficos ya que esta investigación es no experimental y no vamos realizar una comparación con otra técnica.

- **Operacionalizacion de Variables**

VARIABLES INDEPENDIENTES	VARIABLES DEPENDIENTES	INDICADORES
Producción in vitro de embriones bovinos	Cantidad de ovocitos colectados según su calidad	#
	Cantidad de ovocitos maduros	# %
	Cantidad de ovocitos fertilizados	# %
	Viabilidad de embriones	# %

- **Cantidad de Ovocitos Colectados** se expresó en número a través de un conteo directo de tal manera que se los evaluó de acuerdo a las siguientes categorías:

A: completamente rodeado por más de 3 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo su calidad es buena.

B: rodeado parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular se lo considera como regular.

C: desnudo es lo denomina malo.

D: rodeado por fibrina presentándose con un aspecto de tela de araña se lo categoriza como degenerado.

- **Cantidad de Ovocitos Maduros** el número de ovocitos maduros se obtuvo mediante el conteo directo y se determinó en porcentajes de su totalidad de ovocitos clasificados de acuerdo a su estructura y al tiempo transcurrido de maduración in vitro, para lo cual se utilizara la siguiente formula.

$$(\%) \text{ DE OVOCITOS MADUROS} = \frac{\text{OVOCITOS MADUROS} * 100}{\text{OVOCITOS COLECTADOS}}$$

- **Cantidad de Ovocitos Fertilizados** el número de ovocitos fertilizados se obtuvo del número de ovocitos maduros, y el porcentaje de ovocitos fertilizados se lo obtuvo mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ DE OVOCITOS FERTILIZADOS} = \frac{\text{OVOCITOS FERTILIZADOS} * 100}{\text{OVOCITOS MADUROS}}$$

- **Viabilidad de Embriones** el número de embriones generados se los obtuvo de la totalidad del número de ovocitos fertilizados, y se determinó la viabilidad a través de las etapas de la división celular, por medio de porcentajes a través del uso de la siguiente formula.

$$\% \text{ DE EMBRIONES GENERADOS} = \frac{\text{EMBRIONES GENERADOS} * 100}{\text{OVOCITOS FERTILIZADOS}}$$

2.4 DESARROLLO DEL ENSAYO

2.4.1 OBTENCION Y MADURACION DE OVOCITOS IN VITRO

Día 1:

2.4.1.1 ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL Y ASPIRACION DE LOS OVOCITOS

Los ovocitos obtenidos a partir de ovarios de matadero, son transportados al laboratorio en el termo de transporte conteniendo solución fisiológica estéril a una temperatura de 20-25 °C. A esta temperatura, los ovarios podrán permanecer en el termo hasta aproximadamente 6-7 horas sin afectar significativamente los resultados posteriores. Por esta razón, cuando el transporte deba efectuarse durante un período más prolongado, es conveniente disminuir la temperatura hasta unos 15-16 °C.

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron acondicionados, eliminándose los restos de cuerno uterino, oviducto y/o ligamentos y lavados tres veces en solución fisiológica estéril. Posteriormente se procedió a la punción de los folículos de 2-10 mm de diámetro, utilizando agujas de 21g para aspirar su contenido, cuando el líquido llena la jeringa se transfiere suavemente a la caja Petri.

Los ovocitos obtenidos serán posteriormente seleccionados bajo lupa estereoscópica (x30), conservando aquellos que presenten varias capas compactas de células del cumulus y citoplasma homogéneo o con pequeñas granulaciones (grados A y B) (Loos et al., 1991).

2.4.1.2 LAVADO Y SELECCION DE LOS OVOCITOS

Luego de colocar el fluido folicular de la aspiración en las cajas petri. Se colocó la caja petri en el estereomicroscopio para la selección de los ovocitos de grado A y B.

Los ovocitos seleccionados fueron lavados tres veces mediante el pasaje gotas de medio Holding en la placa petri. El propósito de este lavado, fue la eliminación del fluido folicular que vehiculiza los ovocitos, así como también posibles contaminantes provenientes de la sala de punción. Una vez lavados y seleccionados, serán posteriormente colocados en grupos, en placas de cultivo, conteniendo 400µl de medio de maduración en cada celda, y puestos a cultivar en estufa a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂ y humedad a saturación.

2.4.1.2.1 PROCEDIMIENTO DETALLADO

1. Preparar placa de cultivo con 400µl de medio holding en cada celda.
2. Preparar placa de búsqueda.
3. Una vez que se ha concluido la aspiración de los ovocitos, se coloca en la placa petri y se procedió a la búsqueda y selección de los ovocitos, a través de la micropipeta.
4. Una vez recolectados los ovocitos desde la placa de búsqueda, proceder a lavarlos mediante 4 pasajes a través de gotas de medio de maduración
5. Cargar la placa de cultivo con los grupos ovocitos por cada celda.
6. Colocar las placas en la estufa durante 20-24 hs, en las condiciones ambientales descriptas anteriormente.

2.4.1.3 MADURACION DE OVOCITOS EN MICROGOTAS

Una variante a la maduración en placas de cultivo, la constituye el cultivo en microgotas. En este procedimiento se utilizan placas petri, sobre las cuales se efectúan gotas con el medio de maduración, las cuales se cubren con aceite mineral.

2.4.1.3.1 PROCEDIMIENTO DETALLADO

1. Colocar sobre una placa petri una gota de medio de maduración (anclaje). El volumen de la misma dependerá del volumen final de la microgota
2. Luego de efectuar el anclaje, las microgotas se cubren con aceite mineral.
3. A través del aceite mineral, completar el volumen final de la microgota.
4. Colocar los ovocitos a madurar, dentro de las microgotas contenidas en las cajas Petri, luego se realiza el gaseado de las fundas ziploc y se las lleva a la estufa de cultivo.

NOTA: la adición de aceite mineral, tiene por objeto, evitar la deshidratación de los medios, ya que a pesar que las estufas de cultivo brindan un ambiente con máxima humedad, las gotas por presentar una alta relación superficie/volumen, tienden a deshidratarse durante la incubación.

2.4.2 FECUNDACION IN VITRO DE OVOCITOS

Día 2:

Entre 20 y 24 horas de comenzada la maduración (comienzo de la punción de los ovarios) se procede a la fecundación de los ovocitos, utilizándose para este procedimiento, semen congelado-descongelado.

Previo al comienzo de las maniobras de este día, se deberán retirar las placas de maduración y observar la coloración del medio (recordar que por la presencia de rojo fenol, ante una disminución de pH, común en caso de contaminación bacteriana, el medio virará al amarillo), presencia de hongos, y aspecto de los ovocitos (expansión). Una vez verificado esto, se procederá como se indica a continuación.

2.4.2.1 PROCEDIMIENTO DETALLADO

1. Cargar nuevas placas de cultivo con medio de fecundación.

2. Pajuela de semen, descongelar en la plancha térmica a 3.5°C, durante 30 segundos. Posteriormente, y una vez secada la pajuela, se efectuó el corte de uno de sus extremos y se lo introdujo en un tubo de 5 ml. Luego se efectuó el corte del otro extremo y se descarga de este modo la columna de semen dentro del recipiente estéril.
3. Independientemente de la forma de la presentación del semen, este deberá ser acondicionado con el propósito de eliminar diluyentes, células muertas, mediante el gradiente de percoll.

2.4.2.2 ACONDICIONAMIENTO DEL SEMEN POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE PERCOLL®

1. Preparar la columna de percoll en un tubo de centrífuga con 2 ml soluciones de percoll
2. Agregar todo el semen descongelado sobre la columna de percoll por la pared del tubo, de modo que este quede depositado en la parte superior de la misma. Tapar el tubo y colocarlo en la centrífuga a temperatura ambiente durante 5 minutos a 300 revoluciones por minuto.
3. Transcurridos los 5 minutos, sacar el sobrenadante del tubo (diluyente, células muertas, etc.), tomar el pellet del fondo, que contiene los espermatozoides vivos, y colocar en 2 ml de medio de capacitación contenido en un tubo de centrífuga (procedimiento de lavado). Este tubo se centrifugará durante 3 minutos a 300 revoluciones por minuto.
4. Luego de esto, se eliminará el sobrenadante, quedando el pellet, la suspensión de espermatozoides con la cual se procedió a la fecundación.

NOTA: se puede aprovechar este tiempo de 3 minutos para cambiar los ovocitos de las placas de maduración a las nuevas placas con medio de fecundación.

- Una vez obtenida la suspensión de espermatozoides libre de diluyentes y células muertas, se procede a la determinación de la concentración espermática para efectuar la fecundación con la dosis requerida.

- Se prepara una caja de Petri y con el semen ya capacitado y diluido a la concentración deseada, se preparan gotas para la inseminación, cubiertas con aceite mineral.
- Se sacan los ovocitos del medio de maduración, que estaban en la estufa y se colocan por grupos en las gotas de semen.

2.4.2.3 FECUNDACION EN MICROGOTAS

Al igual que en la maduración, la fecundación también se efectuó en microgotas sobre placas petri cubiertas por aceite mineral. En este caso, el procesamiento del semen, se realizó del mismo modo que el descrito previamente.

2.4.2.3.1 PROCEDIMIENTO DETALLADO

1. Colocar en un tubo de 5 ml, el volumen, requerido para la confección de las microgotas. Colocar volúmenes equivalentes a los utilizados en las placas de cultivo y al mismo agregarle la cantidad necesaria de heparina.
2. Luego adicionarle la cantidad de medio de capacitación con los espermatozoides, necesaria para alcanzar la dosis inseminante deseada, homogeneizar, y preparar las microgotas como fue descrito en maduración.
3. Lavar los ovocitos puestos a madurar, previo a ser colocados en las microgotas, en medio de fecundación, para no diluir este medio con el de maduración.
4. Una vez que los ovocitos han sido lavados, colocarlos en las microgotas, posteriormente se realiza el gaseado de las fundas ziploc y se los lleva a la estufa.

2.4.3 CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES

Día 3:

2.4.3.1 ELIMINACION DEL EXCESO DE CELULAS DEL CUMULUS

Luego de 24 hs de la fecundación, los presuntos cigotos deben ser desnudados (eliminación del cumulus), lavados en medio de cultivo y colocados, en este último, en las placas donde se efectuó la maduración de los ovocitos (co-cultivo con células de la granulosa) o en nuevas placas (sin co-cultivo) y colocados en estufa a 38,5 °C en una atmósfera de 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ (contenidas en bolsas gaseadas) y humedad a saturación, momento en el que se procede al conteo de los ovocitos divididos. Posteriormente se continúa con el cultivo hasta el día 7 donde se evaluó el porcentaje de producción de embriones, y se procedió a su criopreservación.

2.4.3.1.1 PROCEDIMIENTO DETALLADO

- 1.** Chequear la placa de maduración por posible presencia de contaminación. Se aspira el contenido y se reemplaza por de medio de cultivo. Posteriormente, se procedió el llenado de nuevas placas, las cuales se colocaron en la estufa hasta su utilización.
- 2.** Preparar micropipetas, necesaria para el manejo de los embriones.
- 3.** Colocar de medio de cultivo en una caja petri, y pasar los presuntos cigotos a esta, para efectuar el desempaque mediante micropipeteo.
- 4.** Posteriormente, aspirarlo y descargar en una placa para la búsqueda.
- 5.** Efectuar la búsqueda y el lavado de los cigotos mediante el pasaje a través gotas de medio de cultivo.
- 6.** Es necesario realizar varios lavados y búsquedas en la placa petri hasta que no aparezcan más cigotos (2 o 3 veces). Posteriormente observar la placa petri bajo lupa para detectar la posible presencia de cigotos adheridos a su pared.

7. Una vez lavados y seleccionados, colocar los presuntos cigotos en las placas de cultivo previamente preparadas.

8. Colocar la placa en estufa y cultivar bajo las condiciones descritas.

La micropipeta de 200 μ l se coloca dentro de la celda, y se procede a aspirar y descargar suavemente este volumen hasta que los ovocitos queden desnudos. Luego de esto proceder con el lavado según se indicó previamente.

2.4.3.2 CULTIVO DE EMBRIONES EN MICROGOTAS

Al igual que en maduración y fecundación, el cultivo también se efectuó utilizando microgotas cubiertas por aceite mineral. El procedimiento es idéntico al de maduración si se desea efectuar el cultivo en ausencia de co-cultivo, mientras que si se utilizan las placas de maduración, este medio debe ser retirado y reemplazado por medio de cultivo.

Para esto, deberá graduarse la micropipeta con un volumen ligeramente inferior al de la microgota, y lavarla dos o tres veces, hasta reemplazar completamente el medio de maduración por el de cultivo.

2.4.4 CONGELACION

2.4.4.1 PROCEDIMIENTO DETALLADO

1. Preparar la solución de criopreservación y colocarla en una placa petri a temperatura ambiente.
2. Identificar correctamente la pajueta.
3. Colocar los embriones en la solución de criopreservación. El tiempo total de exposición de los embriones al crioprotector, fue de alrededor de 10 minutos.

4. Cargar los embriones en las correspondientes pajuelas (Primero una columna de medio de congelación, luego una pequeña columna de aire, seguido a esta la columna con el embrión ya deshidratado, luego otra columna de aire, una columna de medio de congelación y cerrarlas.
5. Comenzar con el enfriamiento inicial colocando las pajuelas directamente a -7°C en la cámara de enfriamiento de una máquina congeladora programable.
6. Efectuar la inducción de la cristalización de manera manual, tocando las pajuelas en uno de sus extremos con un dispositivo metálico enfriado en N_2 líquido.
7. Luego de 5 minutos de inducida la cristalización, comenzar el descenso térmico controlado desde -7°C hasta -35°C a razón de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.
8. Una vez alcanzada la temperatura de -35°C , retirar las pajuelas de la cámara de enfriamiento y efectuar el enfriamiento rápido colocando las pajuelas directamente en N_2 líquido.

2.4.5 DESCONGELACION

2.4.5.1 PROCEDIMIENTO DETALLADO

1. Retirar la pajueta del nitrógeno líquido.
2. Exponer la pajueta al aire durante 5 segundos tomándola desde sus extremos. Con este procedimiento evitamos la ruptura del tapón de fábrica y la entrada de agua dentro de la pajueta durante la descongelación.
3. Introducción de las pajuelas en agua a 35°C durante 30 segundos.
4. Cortar ambos extremos de la pajueta y descargar su contenido sobre una placa de petri. Inmediatamente después, comenzar la búsqueda de los embriones.

5. Una vez hallados, colocarlos en medio de mantención durante 10 a 15 minutos. Posteriormente deberán ser lavados mediante pasajes por gotas de esta solución, y cultivados nuevamente para sus evaluaciones posteriores.

2.4.6 CLASIFICACION EMBRIONARIA

2.4.6.1 ESTADIO DE DESARROLLO EMBRIONARIO.

De acuerdo a las normas de la Internacional Embryos Transfer Society (IETS), la clasificación de los embriones en función de su estadio de desarrollo se efectuó de manera numérica tal como se describe a continuación.

El código para el grado de desarrollo es numérico. El número 1 identifica un ovocito sin fecundar o un embrión de una célula. El número 2 identifica embriones con dos a 16 células. El número 3 identifica una mórula temprana, y los números 4 a 9 identifican a los embriones en estadios posteriores a la compactación, como se ilustra más arriba.

2.4.6.2 CALIDAD EMBRIONARIA.

De acuerdo a las normas IETS, el código para clasificar la calidad embrionaria basada en la integridad morfológica de los embriones es de tipo numérico. Los códigos de calidad embrionaria varían de 1 a 4 como se explica a continuación.

- 1.- Excelente** Masa embrionaria esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Este tipo de embrión se considera en su estadio esperado de desarrollo. Las irregularidades deberían ser relativamente menores, y al menos el 85% del material celular debería de ser una masa embrionaria intacta y viable. Esta apreciación deberá basarse en la evolución de la cantidad de células embrionarias presentes en el espacio perivitelino. La zona pelúcida deberá presentar superficies lisas, sin

superficie cóncavas, planas o delgadas que pudieran causar adhesión de los embriones al material utilizado durante las manipulaciones

- 2.- Bueno** Irregularidades moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y corresponderse a una masa embrionaria viable.
- 3.- Regular** Irregularidades mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y corresponderse con una masa embrionaria viable.
- 4.- Malo** Ovocito o embrión de 1 célula degenerada, no viable (muerto o degenerado)

CAPITULO III

3. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

3.1. NUMERO DE OVOCITOS RECOLECTADOS

CUADRO N°1 RECOLECCION DE OVARIOS Y OVOCITOS

Número de ovarios	150
Número de ovocitos	220

Fuente: Directa
Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

En el cuadro N° 1 se puede apreciar que de 150 ovarios obtenidos de matadero se recolecto 220 ovocitos, indistintamente de su calidad para el proceso de maduración in vitro.

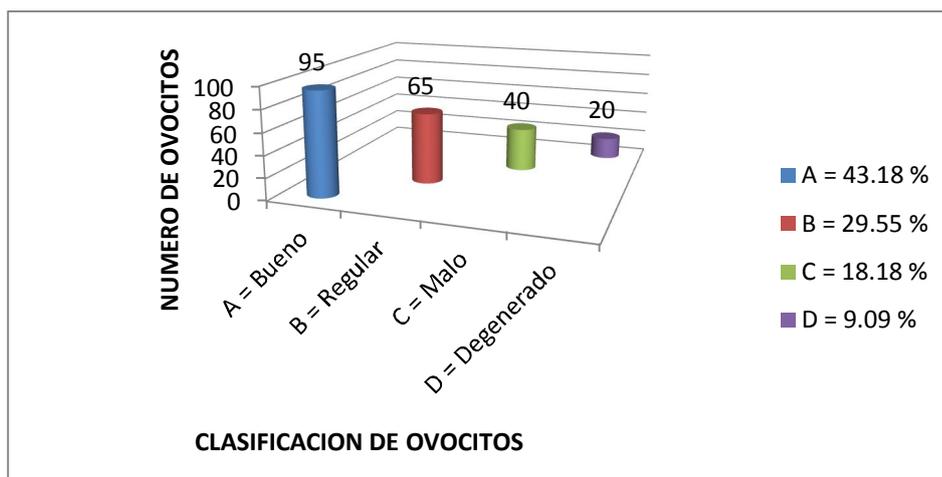
3.2. CLASIFICACION DE OVOCITOS

CUADRO N°2 CATEGORÍAS DE OVOCITOS OBTENIDOS

CATEGORIAS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
A	95	43.18
B	65	29.55
C	40	18.18
D	20	9.09
TOTAL	220	100%

Fuente: Directa
Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

GRAFICO N° 1 CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS



Fuente: Directa
 Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

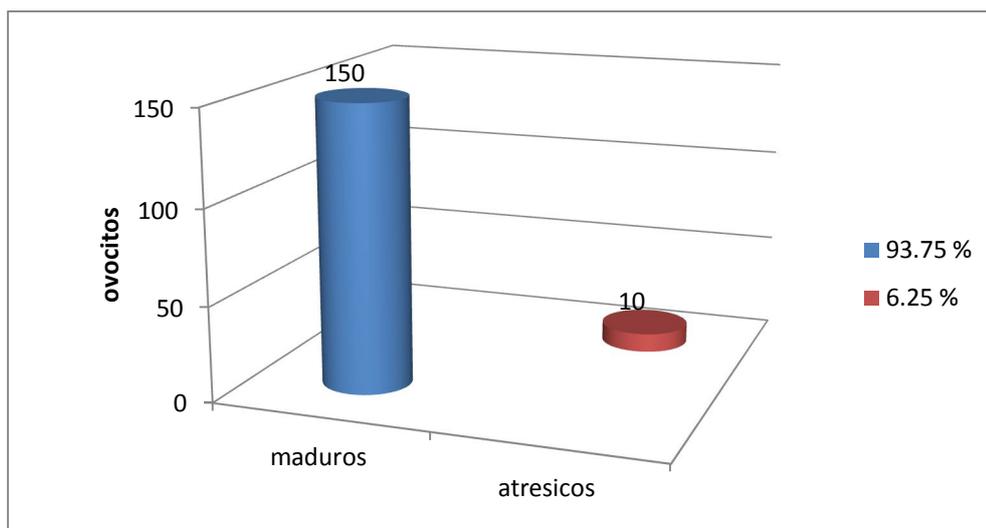
En el cuadro N° 2 y gráfico N° 1, se muestra que de los 220 ovocitos recolectados 95 ovocitos son de categoría A "Bueno" (Completamente rodeado por más de 3 capas de células del cumulus y citoplasma homogéneo), son aptos para maduración in vitro; 65 de categoría B "Regular" (Rodeado parcialmente por células del cumulus o con citoplasma irregular), pueden ser usados en el protocolo de maduración. En el presente experimento se descartaron; 40 de categoría C "Malo" (Desnudo) y 20 de categoría D "Degenerado" (Rodeado por fibrina con aspecto de tela de araña), no son aptos para maduración in vitro.

3.3. NUMERO DE OVOCITOS MADUROS Y ATRESICOS

CUADRO N° 3 OVOCITOS MADUROS Y ATRESICOS

OVOCITOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Maduros	150	93.75
Atrésicos	10	6.25
TOTAL	160	100 %

Fuente: Directa
 Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.
GRAFICO N° 2 OVOCITOS MADUROS Y ATRESICOS



Fuente: Directa
Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

En el cuadro N° 3 y grafico N° 2, se puede observar que para el protocolo de maduración in vitro se obtuvo 160 ovocitos clasificados en categoría A y B, de estos se obtuvieron 150 ovocitos maduros buenos para el posterior protocolo, de la misma manera se obtuvo 10 ovocitos atresicos que no pudieron madurar y no son aptos para fertilizarlos.

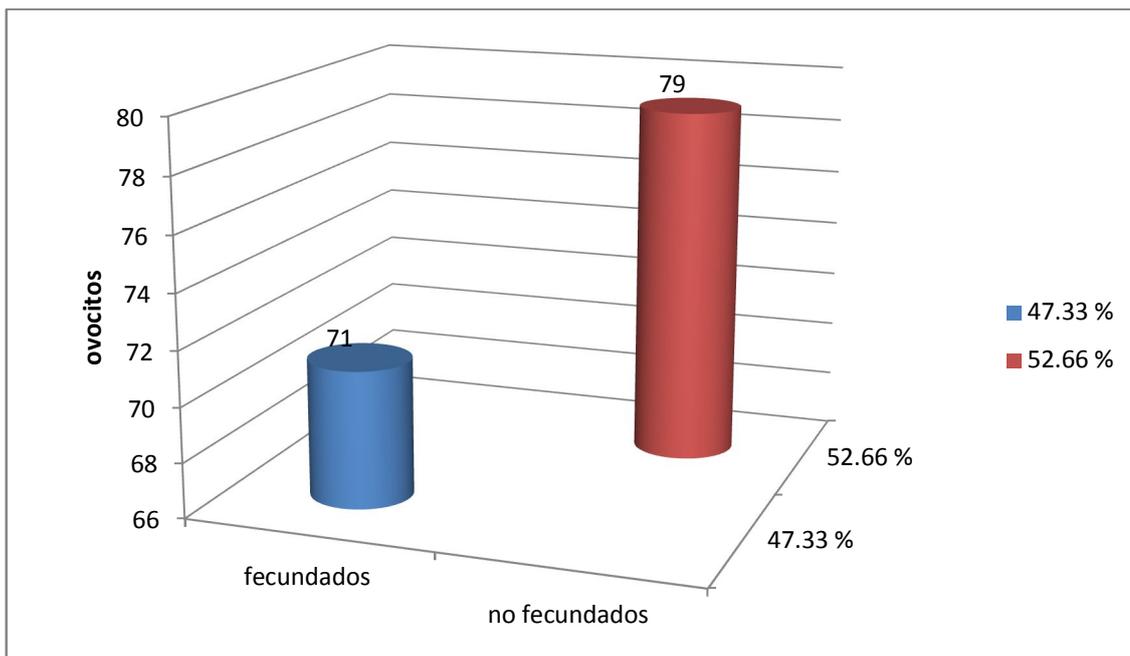
3.4.NUMERO DE OVOCITOS FERTILIZADOS

CUADRO N°4 NUMERO DE OVOCITOS FECUNDADOS.

OVOCITOS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Fecundados	71	47.33
No Fecundados	79	52.66
TOTAL	150	100 %

Fuente: Directa
Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

GRAFICO N° 3 NUMERO DE OVOCITOS FECUNDADOS



Fuente: Directa
Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

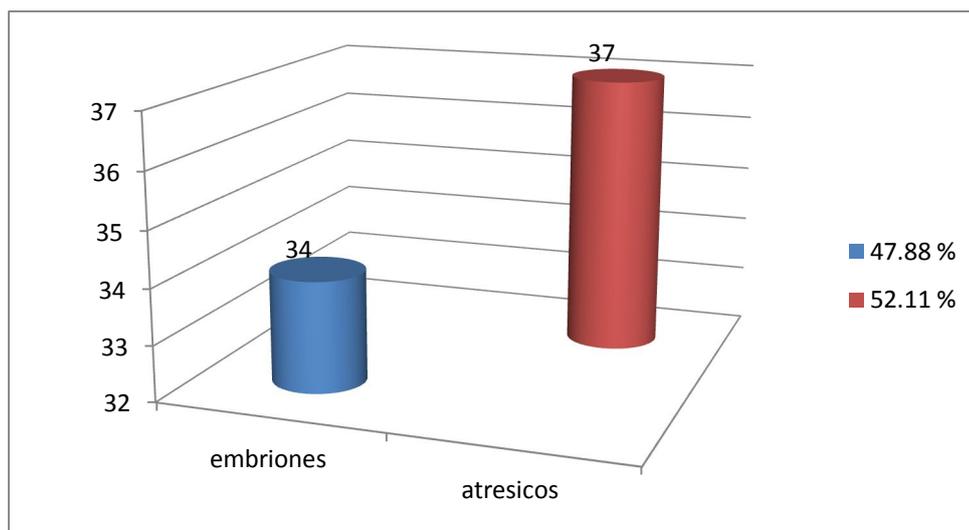
En el cuadro N° 4 y gráfico N° 3, se puede apreciar que en la fecundación in vitro, los ovocitos madurados son cocultivados con espermatozoides en medios especiales y en un ambiente controlado por estufas de cultivo por un tiempo comprendido entre 24 hs, de los cuales 150 ovocitos fueron fertilizados, se fecundaron 71 con un porcentaje de 47.33 y no se fecundaron 79 con un 52.66 %.

3.5.NUMERO DE EMBRIONES PRODUCIDOS

CUADRO N°5 NUMERO DE EMBRIONES.

Embriones	NÚMERO	PORCENTAJE (%)
Desarrollados	34	47.88
Atrésicos	37	52.11
TOTAL	71	100 %

Fuente: Directa
Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.
GRAFICO N° 4 EMBRIONES PRODUCIDOS



Fuente: Directa
Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

En el cuadro N° 5 y grafico N° 4 se muestra que aproximadamente de los 71 ovocitos el 47.88% fueron fecundados y comenzaron a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanzan el estadio de blastocisto o blastocisto expandido. Esto podría sugerir que el cultivo embrionario, es el principal período que determina la eficiencia global del sistema dejándonos así 37 ovocitos no fecundados con un porcentaje de 52.11%.

3.6. CLASIFICACION EMBRIONARIA

CUADRO N°6 ESTADIO DE DESARROLLO Y GRADOS DE CALIDAD

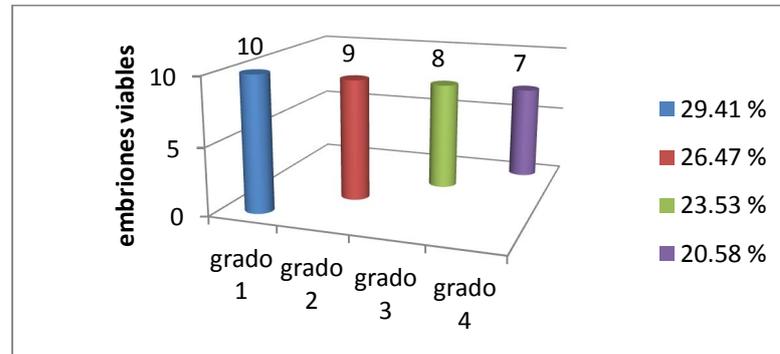
EMBRIONES	NUMERO	PORCENTAJE (%)
(1)Excelente	10	29.41
(2)Bueno	9	26.47
(3)Regular	8	23.53
(4)Malo	7	20.58
TOTAL	34	100 %

Fuente: Directa
Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

En el cuadro N° 6 se muestra el número de embriones obtenidos de acuerdo a su grado de calidad, dándonos así diez (10) embriones excelentes, nueve (9) buenos,

ocho (8) regulares y siete (7) malos, en total 34 embriones de los cuales se puede utilizar veinte y siete (27) para realizar la PIV.

GRAFICO N° 5 ESTADIO DE DESARROLLO Y GRADOS DE CALIDAD



Fuente: Directa

Elaborado por: JÁCOME M, GUAMANTARIO M.

En el gráfico N° 5, se puede observar la viabilidad de los embriones de acuerdo a su grado de calidad, en donde se obtuvo de los 34 embriones obtenidos, 10 son de grado 1 (excelente), en donde la masa embrionaria es esférica y simétrica, con células (blastómeros) uniformes en cuanto a tamaño, color y densidad. Este tipo de embrión se considera en su estadio esperado de desarrollo, Las irregularidades son relativamente menores, y al menos el 85% del material celular es una masa embrionaria intacta y viable. 9 son de grado 2 (Bueno), en donde sus irregularidades son moderadas en cuanto al aspecto, forma, tamaño, color y densidad de las células. Al menos el 50% del material celular se encuentra intacto y correspondiente a una masa embrionaria viable. 8 son de grado 3 (Regular), sus irregularidades son mayores en la forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y corresponderse con una masa embrionaria viable. 7 son de grado 4(malo, muerto o degenerado), estos ovocitos o embriones de 1 célula degenerada, no viable. De los cuales se puede crio conservar los embriones de categoría 1-2-3.

CONCLUSIONES

- En la recuperación de ovarios de mataderos, los factores fisiológicos, hormonales y sanitarios, pueden influir en la cantidad y calidad de los ovocitos obtenidos para la MIV y FIV.
- La recuperación de ovocitos puede realizarse en cualquier etapa del ciclo reproductivo ya que se puede obtener ovocitos de diferente estadio debido a sus ondas foliculares.
- El tiempo entre colección de ovarios e incubación de ovocitos, influye significativamente en el desarrollo embrionario. Para lo cual se debe tener un cuidadoso control en la temperatura y manejo de los ovarios así como de los gametos obtenidos durante todo el proceso dentro del laboratorio.
- La viabilidad de los embriones grado 1 (excelente), se considera en su estadio esperado de desarrollo, Las irregularidades son relativamente menores, y al menos el 85% del material celular es una masa embrionaria intacta y viable.

RECOMENDACIONES

- Se debe incentivar a los estudiantes para realizar este tipo de investigaciones, no solo sobre este tema, sino también ampliando los horizontes para que exista información de bien público para nuestro medio.
- Por seguridad es recomendable utilizar la indumentaria necesaria para evitar posibles enfermedades y a la par contaminar los protocolos para la producción de embriones.
- Cuando se tiene en maduración los ovocitos y embriones no se debe manipular la estufa (baño maría) debido a que estos se encuentra con una temperatura y humedad optima, por ello se debe respetar el tiempo en el cual deben permanecer ahí hasta su posterior control.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Libros:

1. ÁLVAREZ, Armando; PEREZ, Héctor; HERNÁNDEZ, Tania; QUINCOSA, Jorge, SANCHEZ, Alexei. Fisiología animal aplicada, Editorial Universidad de Antioquia. ISBN 978-958-714-219-8
2. AUDESIRK. Biología de la Vida en la Tierra sexta edición 2003, ISBN 970-26-03706
3. BURADE, Carlos 1994. Zootecnia bases de producción animal, capítulo XVI, edición Mundi Prensa, tomo 1, ISBN 84-7114-535-9
4. CASTRO R, Álvaro. Producción bovina, pag 139-144, editorial universidad estatal a distancia San José Costa Rica 1999, ISBN 9977-64-082-3
5. CUNNINGHAM, James. Fisiología veterinaria, cuarta edición 2009, ISBN 978-84-8086-391-9
6. Dr. LEYVA, Carlos. Transferencia no quirúrgica de embriones en el ganado bovino. México. ISBN 970-9051-00-8
7. Dr. RIVAS, Raymundo. Manual de prácticas de biología de la reproducción, Academia de Biología 2011, Ciudad Juárez, Chihuahua.
8. DVORKIN, M y CARDINALI, D. Bases fisiológicas de la práctica médica, 13^o edición, Buenos aires: Editorial medica Panamericana; 2005, pag 663.
9. FILIPIAK, Yael y LAROCCA, Clara. Manual de Fertilización in vitro en bovinos, Facultad de Veterinaria – Universidad de la República Montevideo, República Oriental del Uruguay marzo de 2010.
10. GARDE, Julian y GALLEGRO, Laureano. Nuevas técnica de reproducción asistida aplicadas a la producción animal, , graficas cuenca 1996, capítulo 7, ISBN 84-89492-31-X

11. GOMES DE LA TORRE VARGAS, Miracruz. La fecundación in vitro y la filiación, , editorial jurídica de chile, primera edición 1993, ISBN 956-10-1006-2
12. GRUNERT, Eberhad y BERCHTOLD, Max. Infertilidad de la vaca, pag 37-38, primera edición 1988, ISBN 950-504-407-1
13. HAFEZ, 1990. Reproducción e inseminación artificial en animales, capítulo 6, quinta edición, ISBN 968-25-1447-9
14. HERNANDEZ, Marco. Endocrinología fisiología general, editorial universitaria primera edición 1994
15. KOLB, Erich. Fisiología veterinaria, capítulo 3 editorial Acribia 1979, ISBN 84-200-0365-4
16. MARTINEZ, E; RUIZ, S; ROCA, J y VASQUEZ, JM. Fecundación in vitro en los animales de granja, editorial ingramur 1989 capítulo 9 y 10, ISBN 84-7684-189-2
17. MORTORRELL, Héctor. Biotecnología del transporte y micro manipulación de embriones bovinos y camélidos de los andes, AFA editores importadores SA, primera edición 2000.
18. PALMA. Gustavo. Biotecnología de la reproducción, pag 37-52, impresión en argentina 2001, ISBN 987-43-3769-6
19. RODRÍGUEZ, Caravaca. Bases de la producción animal, edición 2003, RC impresores SCA, ISBN 84-472-0764-1
20. RUIZ, Manuel y RIVERA, Bernardo. Reproducción animal métodos de estudio en sistemas, editorial Rispal 1998, ISBN 0253-4746

Revistas:

1. Dr. NEBEL, Ray. Fisiología Reproductiva, Especialista en Reproducción, Select Sires.
2. Laboratorio de biotecnología de la reproducción, INTA Balcarce.
3. MELDE, Jarnette. Anatomía y Fisiología de la Reproducción, Select Sires.

Enlaces Web:

- a. http://www.revistamvzces.com/revistas/vol4no2/Articulo_3.pdf
[17/02/2013/11:05](#)
- b. <http://agropecuarios.net/caracteristicas-de-la-produccion-in-vitro-de-embriones.html> 17/02/2013/10:10
- c. <http://www.a-campo.com.ar/espanol/bovinos/bovinos3.htm>
17/02/2013/11:50
- d. [http://www.selectsires.com/dairy/SpainResources/reproductive_anatomy_s
panish.pdf](http://www.selectsires.com/dairy/SpainResources/reproductive_anatomy_spanish.pdf) 17/02/2013/2:16
- e. <http://reynaldovelazquez.wordpress.com/> 2008/08/16/5:50

ANEXOS

ANEXO 1

GLOSARIO DE TERMINOS

À

Acrosóma: es un pequeño depósito situado en el extremo apical de la cabeza del [espermatozoide](#) y que contiene [enzimas](#) hidrolíticas.

Agua Ultra Pura: es extremadamente pura y contiene una concentración muy baja de sales, de componentes orgánicos/pirógenos, oxígeno, sólidos suspendidos y bacterias.

Apoptóticas: es una forma de muerte celular programada que está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

Aspiración Folicular: es la punción transvaginal de los folículos ováricos.

Ð

Bidestilada: es agua de un alto nivel de pureza; de baja conductividad eléctrica y alta constante dieléctrica.

Biomarcadores: es un segmento de [ADN](#) con una ubicación física identificable ([locus](#)) en un [cromosoma](#) y cuya [herencia genética](#) se puede rastrear.

Blastocele: es la región central de la [blástula](#) (o blastósfera), que está llena de [fluido](#).

Blástula: Vesícula o cavidad formada por el blastodermo en fase de desarrollo del ovulo.

Blastómero: son un tipo de [células](#) embrionarias [animales](#) indiferenciadas resultantes de la [segmentación](#) del [cigoto](#) después de la [fecundación](#).

BO: Brackett and Olophnt

C

Célula Haploide: es aquella que contiene un solo juego de cromosomas o la mitad (n, haploide) del número normal de [cromosomas](#) en [células diploides](#) (2n, [diploide](#)).

CL: Cuerpo lúteo o cuerpo amarillo.

Congelación: Detención o inmovilización del desarrollo o crecimiento o del movimiento de algo:

Criopreservacion: es el proceso en el cual [células](#) o [tejidos](#) son [congelados](#) a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 °C y -196 °C para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de *vida suspendida* por mucho tiempo.

Cristalización: es un proceso por el cual a partir de un [gas](#), un [líquido](#) o una [disolución](#) los [iones](#), [átomos](#) o [moléculas](#) establecen [enlaces](#) hasta formar una [red cristalina](#), la unidad básica de un [cristal](#).

Cultivo: Método que tiene por fin desarrollar en un medio dado, que puede ser natural o artificial.

Ꭰ

Diploteno: Cuarto estadio de la primera profase meiótica de la gametogénesis, en la que las tétradas muestran quiasmas entre las cromátides de cromosomas homólogos pareados y se produce un entrecruzamiento genético.

D-Tcm-199: Medio de desarrollo (Tissue Culture Médium).

Ꭱ

Embrión: Germen o rudimento de un cuerpo organizado antes de desarrollarse lo bastante para que se conozcan sus caracteres distintivos.

Estadio: Etapa o fase de un proceso, desarrollo o transformación:

Ꭲ

FIV: Fecundación in vitro

Folículos: consisten en una célula gamética, rodeada de [células](#) diploides denominadas células de la granulosa, y por fuera de estas están las células de la teca.

FSH: hormona folículo estimulante

I

IETS: Embryos Transfer Society

In Vitro: ([latín: dentro del vidrio](#))^{1 2} se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un [tubo de ensayo](#), o generalmente en un ambiente controlado fuera de un [organismo vivo](#).

Interferones: son unas [proteínas](#) producidas naturalmente por el [sistema inmunitario](#) de la mayoría de los animales como respuesta a agentes patógenos, tales como [virus](#) y [células cancerígenas](#).

L

LH: hormona Luteinizante

M

Medios: consta de un [gel](#) o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de [pH](#) y [temperatura](#), el crecimiento de [virus](#), [microorganismos](#), [células](#), [tejidos vegetales](#) o incluso pequeñas [plantas](#).

Mesosalpinx: Membrana revestida de peritoneo que recubre la trompa y forma el ligamento ancho del útero.

MIV: Maduración in vitro

Mórula: (del latín morum, mora, ya que tiene ese aspecto) es una masa de células que se da como consecuencia de la segmentación de la célula inicial o cigoto, la cual sufre numerosas divisiones en forma de blastómeros que acaban por desencadenar esta forma característica, normalmente atribuida a aquella estructura que se compone de 32 células.

MOSM: es una [unidad de medida](#) no perteneciente al [Sistema Internacional](#) que define el número de [moles](#) de un [compuesto químico](#) que contribuyen a la [presión osmótica](#) de una [disolución](#).

Motilidad: es un término de la [biología](#) para expresar la habilidad de moverse espontánea e independientemente.

○

Osmosis: es un [fenómeno físico](#) relacionado con el movimiento de un solvente a través de una [membrana semipermeable](#).

Ⓟ

PBS: Buffer fosfato salino

PIV: Producción in vitro

Protocolo: Uno o un conjunto de procedimientos destinados a estandarizar un comportamiento humano u sistemático artificial frente a una situación específica.

Protrusión: Avanzamiento anormal de una parte, tumor u órgano, por aumento de [volumen](#) o por una [causa](#) posterior que lo empuja.

Punción: (Del latín *pungere*, pinchar.) [Operación](#) que consiste en practicar una abertura estrecha en un órgano, con el objeto de dar salida a un [líquido](#) normal o [patológico](#).

§

Secretoma: es el estudio del conjunto de [proteínas secretadas](#) (secretoma) por una determinada [célula](#), [tejido](#) u [órgano](#).

Solución Stock: Se denomina solución madre o stock a composiciones concentradas de nutrientes las cuales están formuladas por sales minerales que se emplean en un medio particular.

V

Vitrificación: es el proceso de conversión de un material en un sólido [amorfo](#) similar al [vidrio](#), carente de toda [estructura cristalina](#).

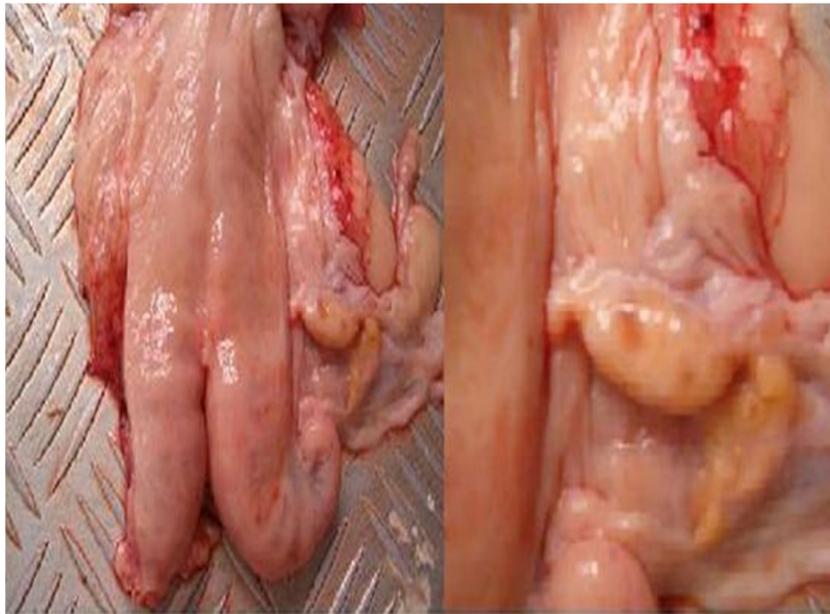
ANEXO 2

MEDIOS UTILIZADOS PARA MIV, FIV Y CULTIVO DE EMBRIONES



FOTOGRAFIA TOMADA DE LOS MEDIOS UTILIZADOS PARA FIV, PIV Y CULTIVO DE EMBRIONES

ANEXO 3
OBTENCION DE OVARIOS



FOTOGRAFIA TOMADA DE LA OBTENCION DE LOS OVARIOS

ANEXO 4
ASPIRACION DE OVOCITOS

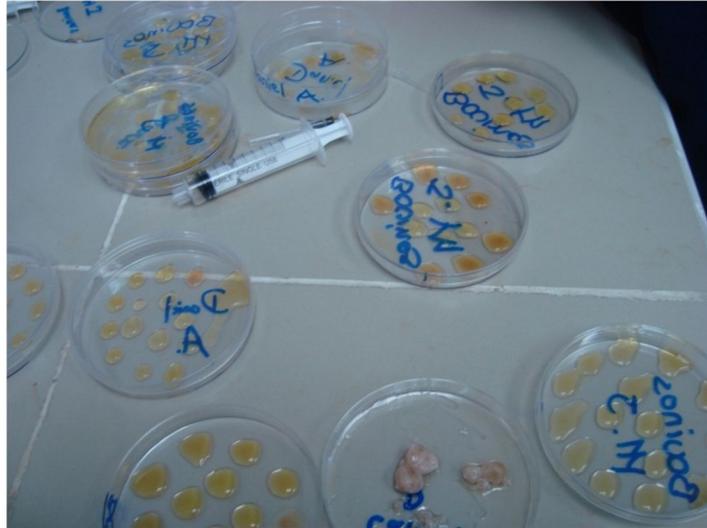




FOTOGRAFIAS TOMADAS ASPIRANDO LOS OVOCITOS DE LOS FOLICULOS OVARICOS

ANEXO 5

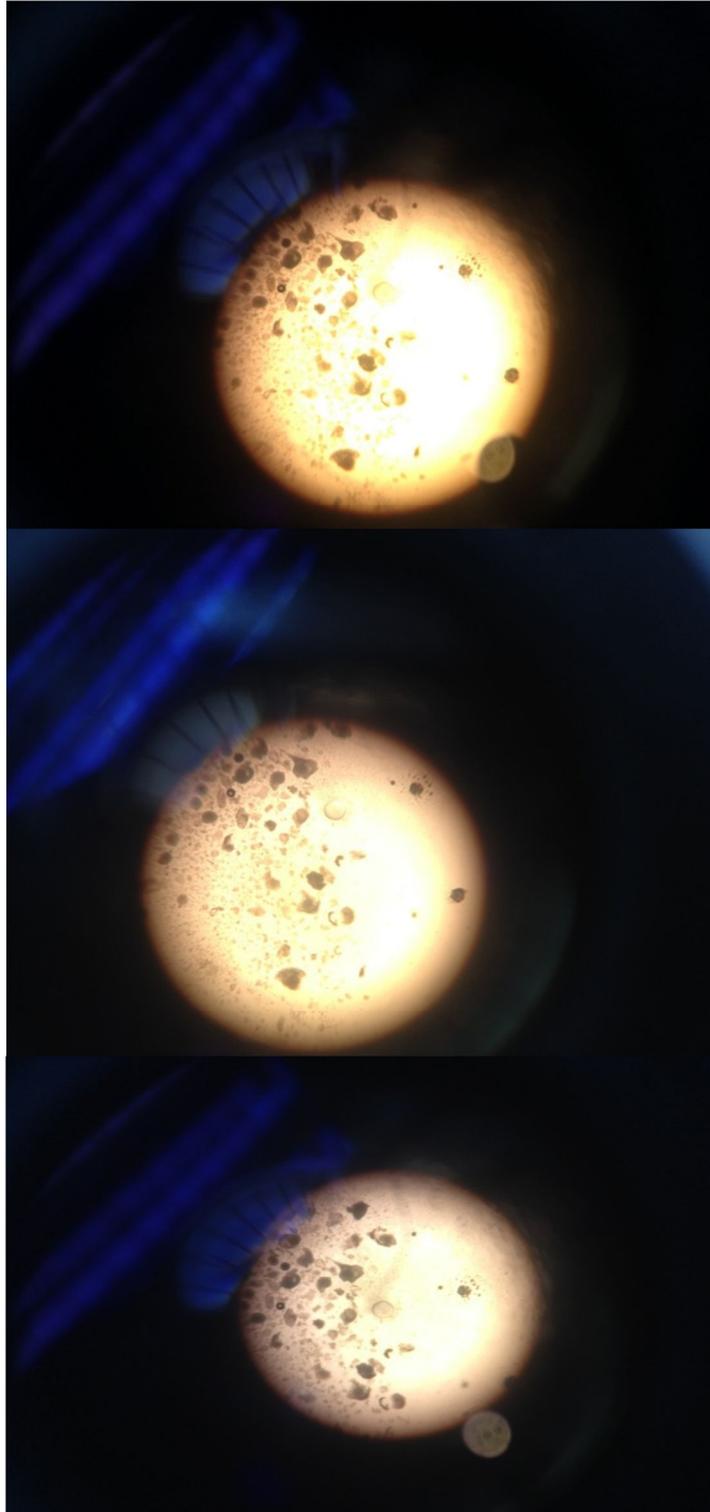
SELECCION DE OVOCITOS ASPIRADOS



FOTOGRAFIA TOMADA DE LAS CAJAS PETRI QUE CONTIENEN LIQUIDO FOLICULAR



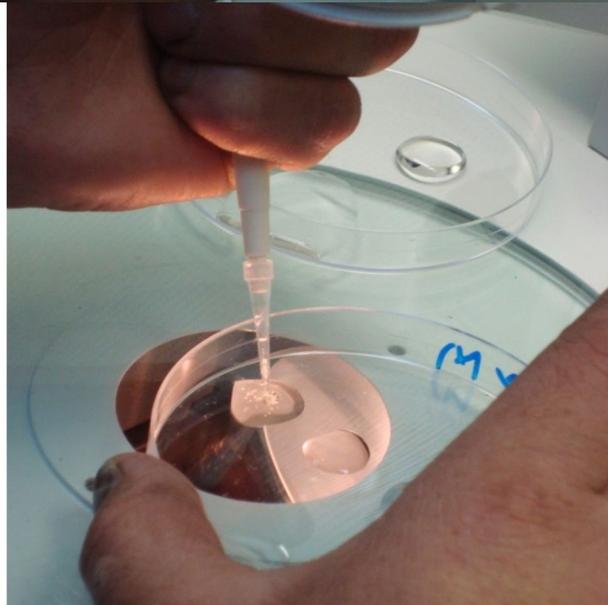
FOTOGRAFIA TOMADA AL MOMENTO DE REALIZAR LA SELECCION DE OVOCITOS



FOTOGRAFÍAS TOMADAS ATRAVÉS DEL ESTEREOMICROSCOPIO DE
LOS OVOCITOS

ANEXO 6

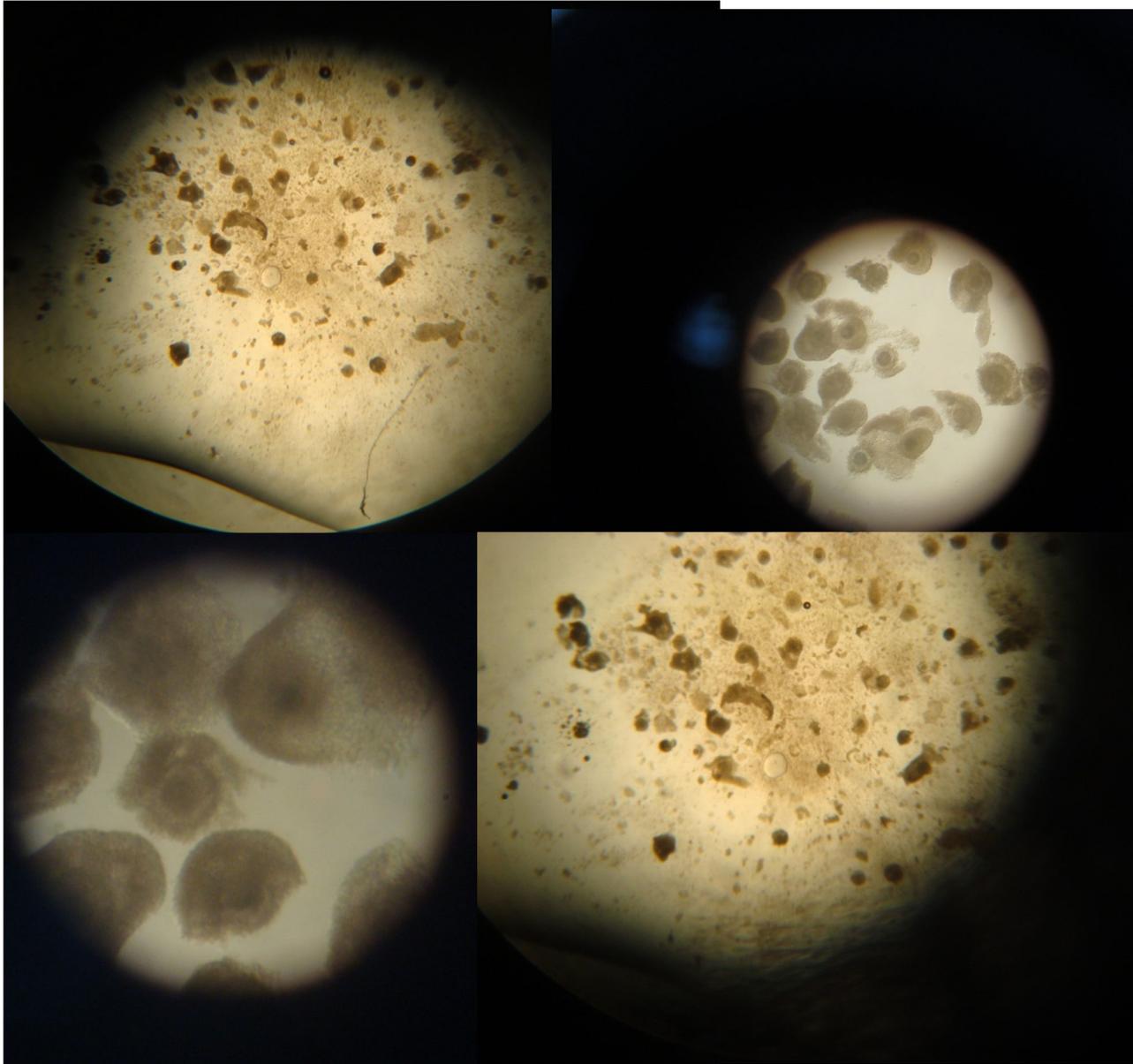
LAVADO DE OVOCITOS



FOTOGRAFIAS TOMADA DEL LAVADO DE OVOCITOS

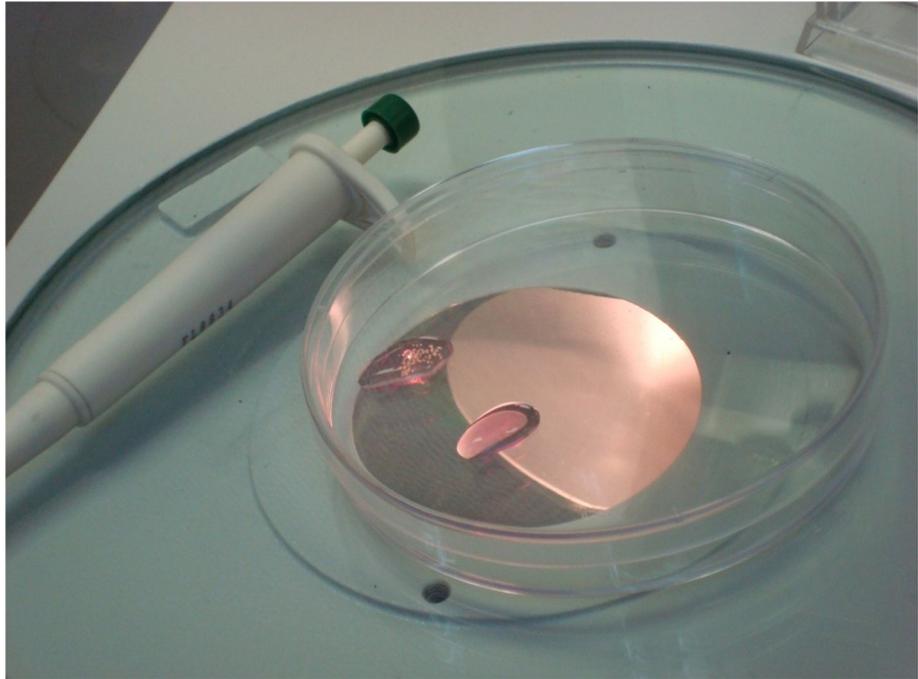


FOTOGRAFÍAS TOMADAS DEL L
LOS OVOCITOS

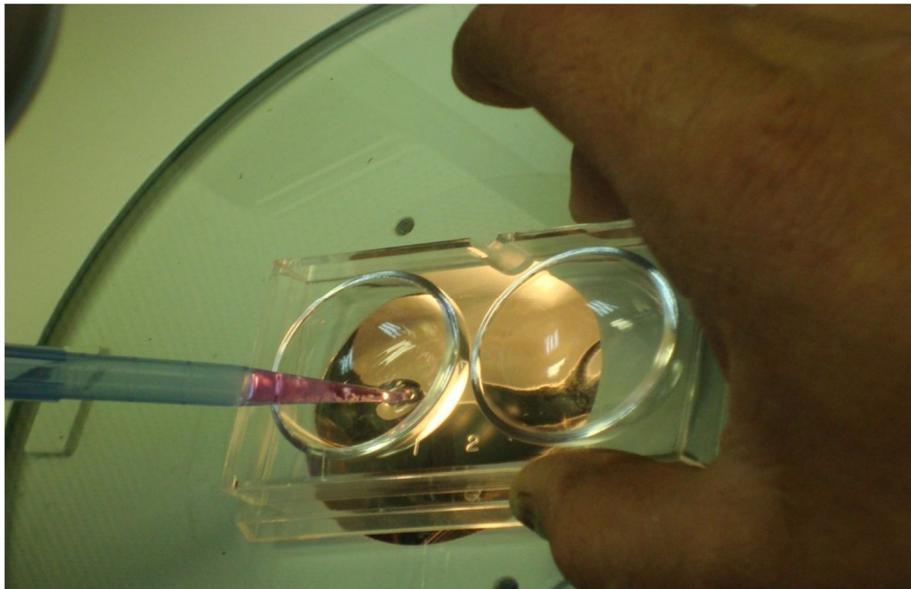


FOTOGRAFÍAS TOMADAS ATRAVÉS DEL ESTEREOMICROSCOPIO DE
LOS OVOCITOS LAVADOS Y CLASIFICADOS

ANEXO 7
MADURACION DE OVOCITOS



FOTOGRAFIA TOMADA DE OVOCITOS LISTOS PARA MADURAR



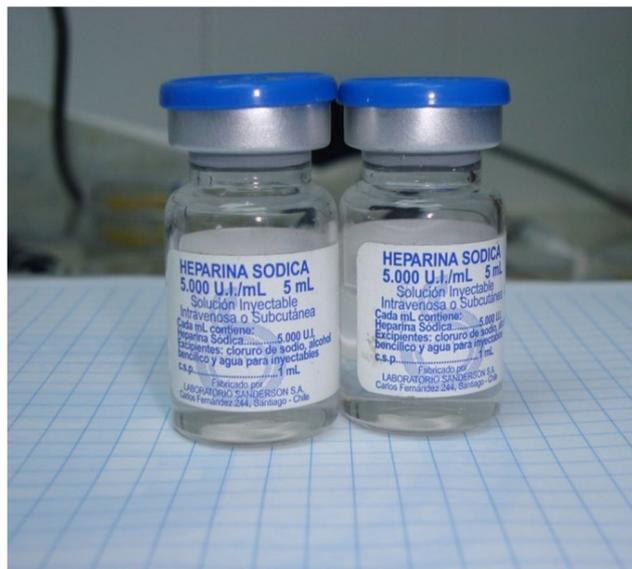
FOTOGRAFIA TOMADA DE LA COLOCACION DE LOS OVOCITOS

ANEXO 8

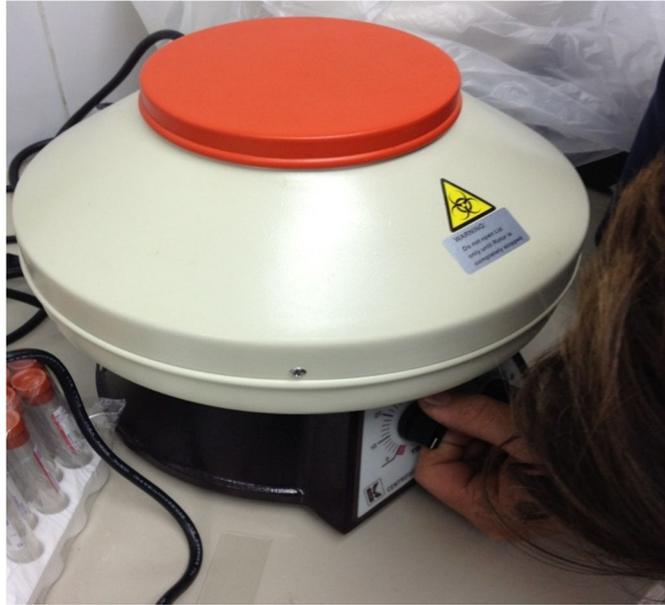
CAPACITACION ESPERMATICA



FOTOGRAFIA TOMADA DE LA CENTRIFUGACION DEL SEMEN



FOGRAFIA TOMADA DEL MEDIO DE CAPACITACION ESPERMATICA



FOTOGRAFIA TOMADA DE LA SEGUNDA CENTRIFUGACION



FOTOGRAFIA TOMADA DE LA SUSPENSION DE ESPERMATOZOIDES
CON LO QUE SE REALIZARA LA FECUNDACION

ANEXO 9

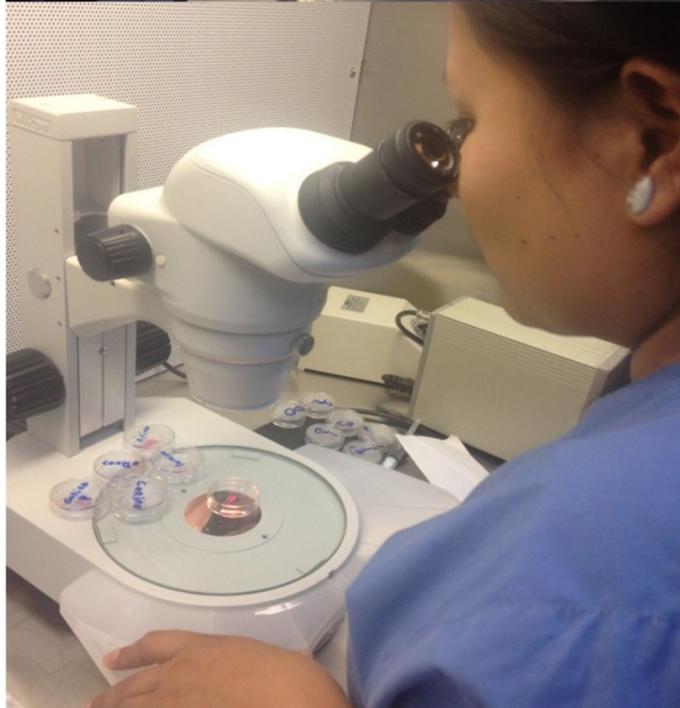
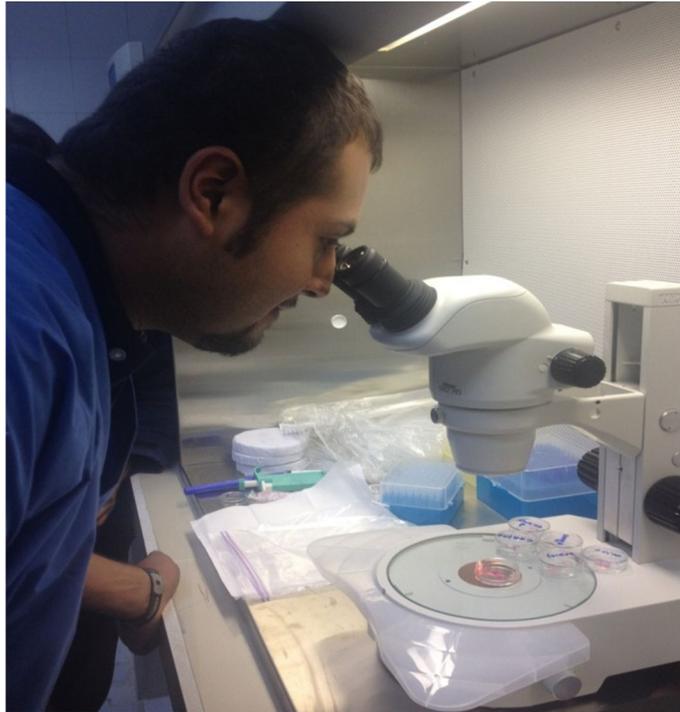
FERTILIZACION DE OVOCITOS



FOTOGRAFIA TOMADA DE LA ASPIRACION Y COLOCACION EN LA CAJA PETRI DEL MEDIO DE FECUNDACION



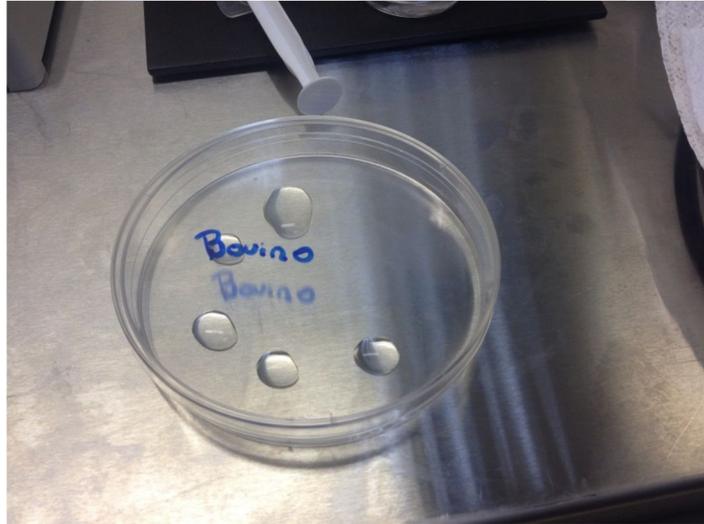
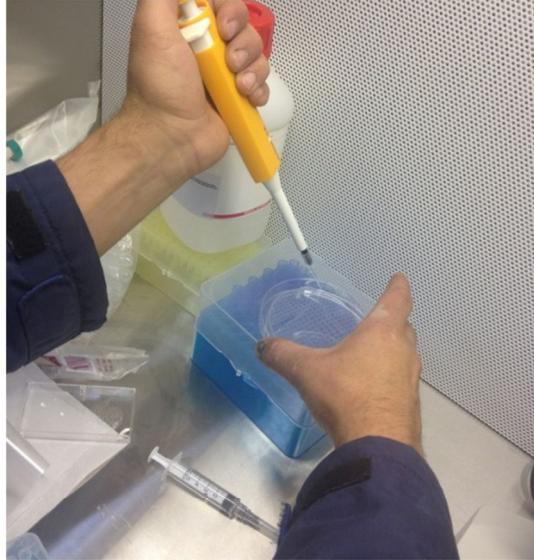
FOTOGRAFIA TOMADA DE LOS OVOCITOS MADUROS FUERA DE LA ESTUFA



FOTOGRAFÍAS TOMADAS DE LA BUSQUEDA DE OVOCITOS EN LA PLACA PETRI

ANEXO 10

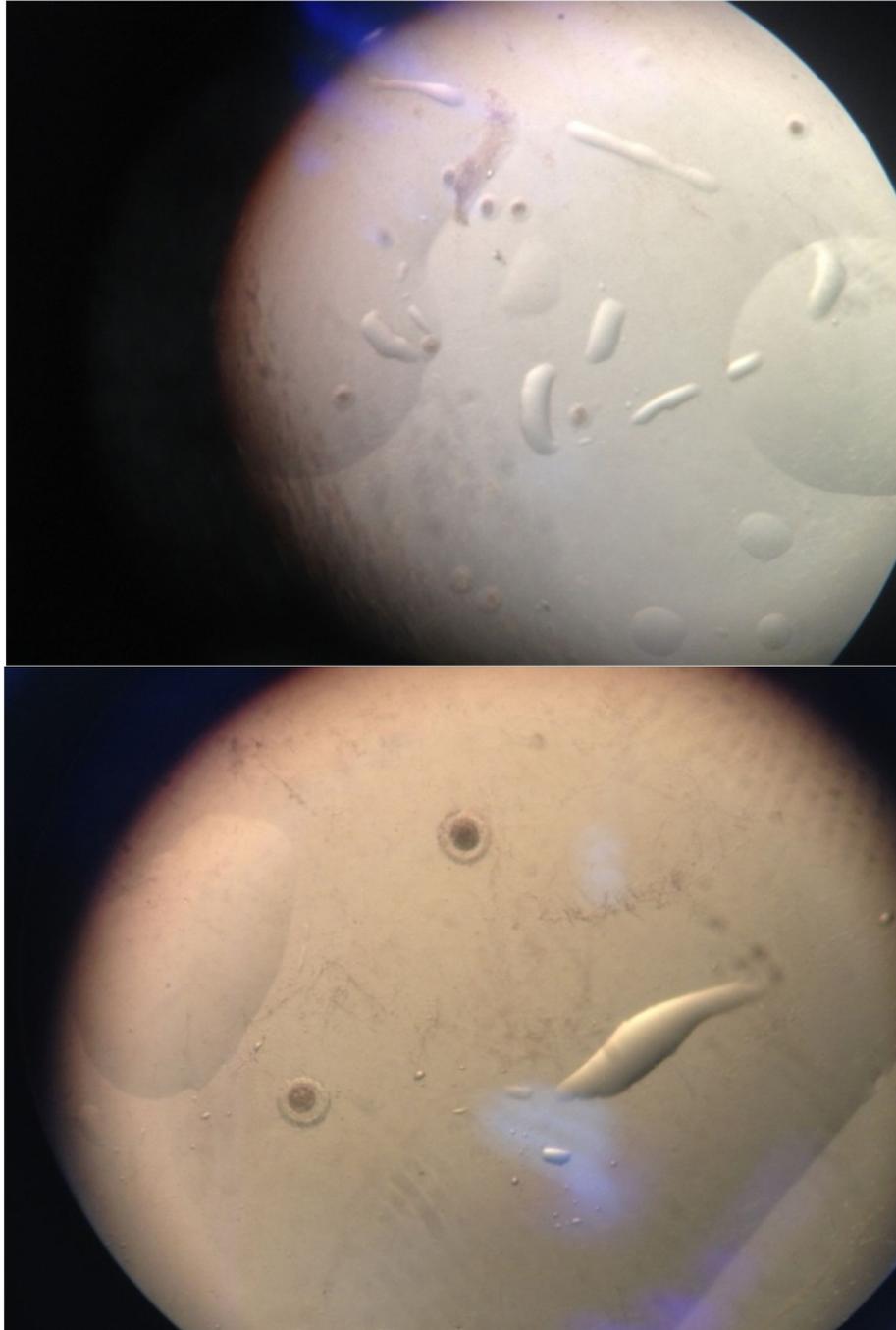
CULTIVO DE EMBRIONES



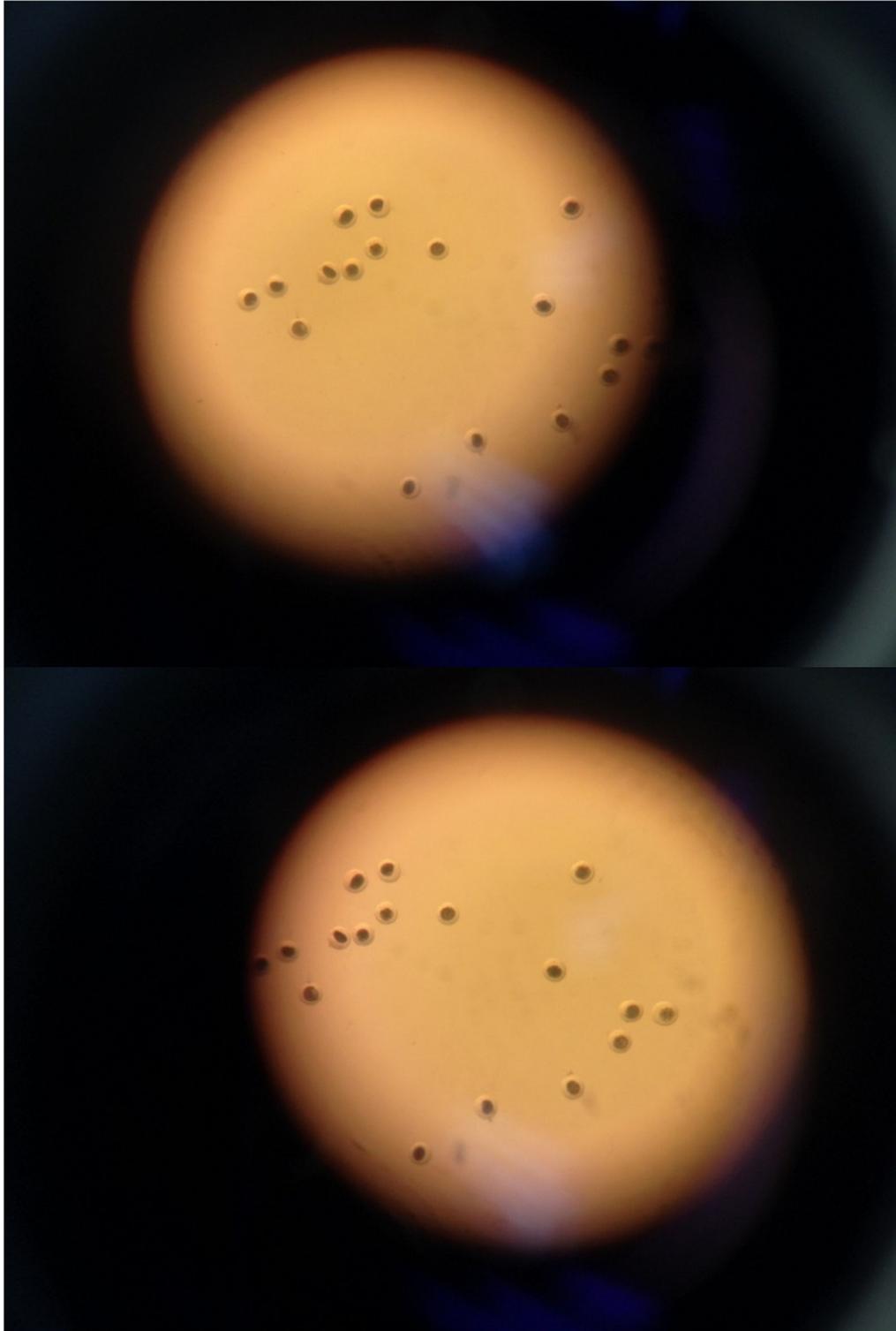
FOTOGRAFIAS TOMADAS DE LA COLOCACION DEL ACEITE
MINERAL EN LA CAJA PETRI

ANEXO 11

CLASIFICACION EMBRIONARIA



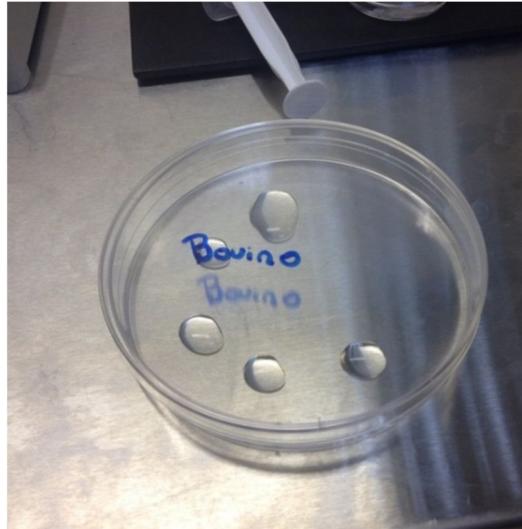
FOTOGRAFÍAS TOMADAS DE LA OBSERVACIÓN DE LOS EMBRIONES
ATRAVEZ DEL ESTEREOMICROSCOPIO



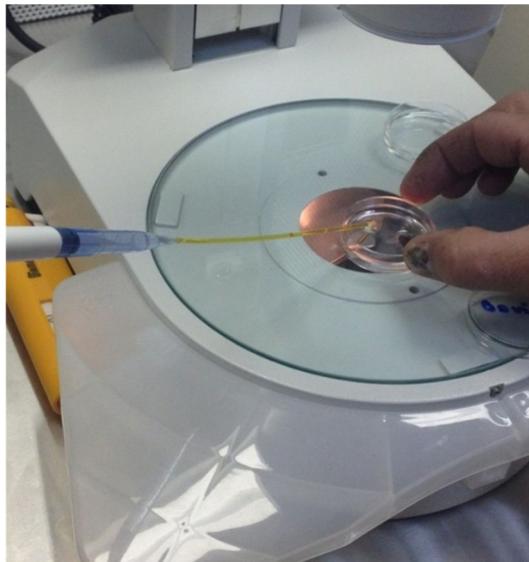
FOTOGRAFÍAS TOMADAS DE TODOS LOS EMBRIONES

ANEXO 12

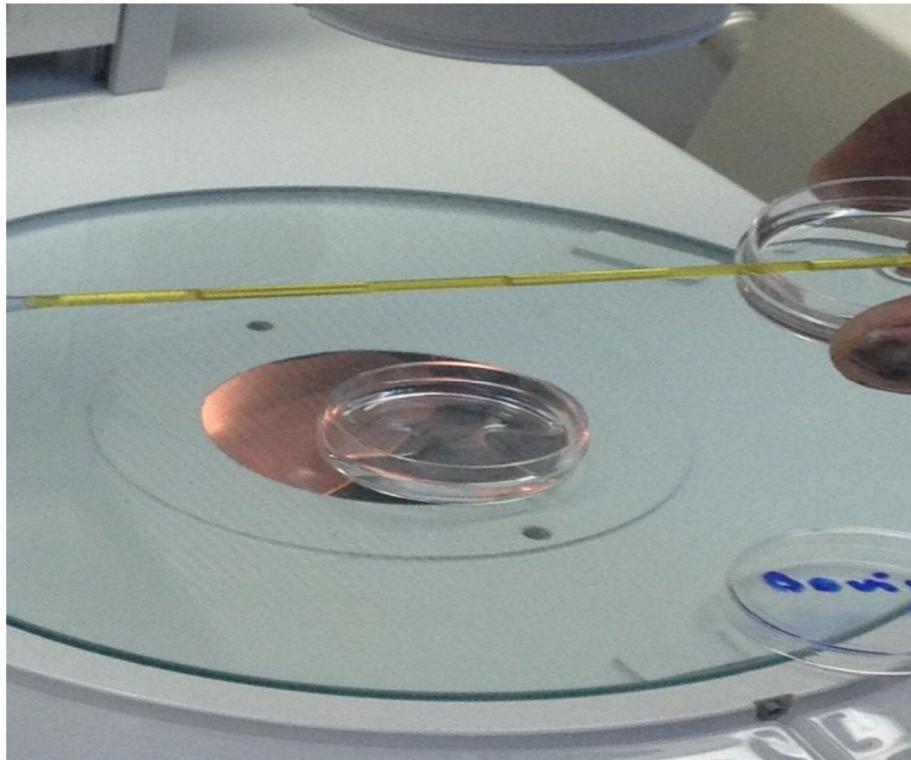
CRIOCONSERVACION DE EMBRIONES



FOTOGRAFIA TOMADA DE LA PREPARACION DEL CRIOCONSERVANTE Y COLOCACION DE LOS EMBRIONES



FOTOGRAFIA TOMADA COMO SE CARGA LA PAJUELA DE EMBRIONES



FOTOGRAFÍAS TOMADAS DE LAS PAJUELAS CARGADAS



FOTOGRAFÍAS TOMADAS DEL ENFRÍAMIENTO DE LAS PAJUELAS