



Universidad Católica de Cuyo
Facultad de Ciencias Veterinarias

TESINA DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO.

“Actualización en fertilización in vitro (FIV) en bovinos”

TESINISTA: Mizrahi Matias Federico

DIRECTOR: Dr. Vet. Mareco Gonzalo

Año 2022
San Luis, Argentina.



CONTENIDO

1. Resumen	6
1.2 abstract	6
2. Objetivo general	6
3. Introducción	7
4. Metodología	8
5. La fertilización in vitro	8
6. Descripción anatómica y fisiológica del aparato reproductor de la hembra bovina	9
6.1 Ovarios	9
6.2 Oviductos	10
6.3 Útero y cuernos	11
6.4 Cérvix	12
6.5 Vulva	12
6.6 Vagina	13
7. Ciclo estral	15
7.1 Estro	16
7.2 Metaestro	16
7.3 Diestro	16
7.4 Proestro	16
8. Crecimiento folicular	17
9. Grupo activo sexualmente	17
10. Pubertad	19



11. Descripción anatómica del aparato reproductor del macho bovino.....	20
11.1 Los testículo.....	20
11.2 Epidídimo.....	22
11.3 Conducto deferente.....	22
11.4 Uretra.....	22
11.5 Glándulas sexuales accesorias.....	22
11.6 Próstata.....	23
11.7 Glándulas bulbo uretrales o de Cowper.....	23
11.8 Glándulas vesiculares.....	23
11.9 Pene.....	23
11.10 Prepucio.....	23
12. El semen y sus características.....	24
12.1 Espermatozoide.....	24
13. Pasos de la fertilización in vitro.....	25
14. Proceso de obtención de ovocitos.....	26
14.1 Obtención de ovocitos provenientes de ovarios de vacas y vaquillonas de matadero o por ovariectomías.....	27
14.2 Técnica de aspiración folicular (Ovum Pick-Up; OPU).....	29
14.3 Obtención de ovocitos mediante el método laparoscópico.....	37
14.4 Recolección de ovocitos mediante el método quirúrgico.....	37



15. Maduración de los ovocitos in vitro (MIV).....	38
16. Diferencias entre <i>Bos taurus</i> y <i>Bos indicus</i>.....	41
17. Proceso de extracción de semen.....	42
17.1 Método de la vagina artificial.....	42
17.2 Método del masaje por vía rectal.....	45
17.3 Método de electroeyaculación.....	45
18. Proceso de congelación del semen.....	47
19. Proceso de capacitación espermática.....	49
20. Fecundación de los ovocitos y cultivo de los embriones..	53
20.1 Cultivo de los embriones.....	55
20.2 Parámetros biofísicos y elementos inorgánicos para los medios de cultivo.....	56
21. Siembra del embrión.....	60
22. De la hembra receptora.....	61
23. El uso de semen sexado en FIV.....	62
24. Resultados.....	62
25. Conclusión.....	63

LISTADO DE GRÁFICOS Y FIGURAS

Imagen 1 Representación gráfica de ovario con sus distintos desarrollos foliculares.....	10
Imagen 2 Representación gráfica del oviducto.....	11
Imagen 3 Representación gráfica de cuernos, cuerpo y cuello del útero.....	12
Imagen 4 Representación gráfica del cérvix.....	12
Imagen 5 Figura de la vulva de la hembra bovina.....	13
Imagen 6 Representación gráfica del aparato reproductor de la hembra bovina.....	14



Imagen 7 Figura de vaca montando a otra vaca en estro.....	18
Imagen 8 Representación gráfica del aparato reproductor del toro.....	19
Imagen 9 Representación gráfica del testículo del toro.....	20
Imagen 10 Representación gráfica del espermatozoide.....	23
Imagen 11 Figura del aparato reproductor de la hembra bovina.....	26
Imagen 12 Figura de los ovarios de la hembra bovina.....	27
Imagen 13 Figura de ecógrafo utilizado en OPU.....	27
Imagen 14 Figura de ovario visto en ecografía.....	28
Imagen 15 Figura de instalación utilizada para contener a los bovinos.....	30
Imagen 16 Figura de aplicación de anestesia epidural.....	31
Imagen 17 Representación gráfica de la técnica utilizada para OPU.....	31
Imagen 18 Figura de fluido obtenido filtrándose.....	32
Imagen 19 Figura de búsqueda y clasificación de los ovocitos.....	33
Imagen 20 Figura de ovocito categoría I.....	34
Imagen 21 Figura de ovocito categoría I y II.....	34
Imagen 22 Figura de ovocito con pocas células del cumus.....	35
Imagen 23 Figura de ovocito categoría III y IV.....	35
Imagen 24 Figura de ovocito V.....	35
Imagen 25 Figura de vagina artificial para bovinos.....	42
Imagen 26 Figura de toro montando un maniquí para extracción de semen.....	43
Imagen 27 Figura de toro montando una vaca para extracción de semen.....	43
Imagen 28 Figura de un electroeyaculador.....	45
Imagen 29 Figura de electroeyaculador en el recto de un toro.....	45
Imagen 30 Figura de pajuelas de semen dentro de un termo de nitrógeno.....	47
Imagen 31 Representación gráfica del proceso fisiológico de capacitación espermática.....	48



Imagen 32 Representación gráfica de contenido seminal post centrifugación.....	50
Imagen 33 Representación gráfica de capacitación espermática in vitro.....	50
Imagen 34 Representación gráfica de espermatozoides compitiendo para penetrar en el ovocito.....	51
Imagen 35 Representación gráfica de la evolución del embrión.....	57
Imagen 36 Representación gráfica de una pajuela con el embrión, pipeta plástica y la pistola de Cassou lista para implantar el embrión.....	58
Imagen 37 Representación gráfica de una pajuela con un embrión congelado.....	58

1. Resumen

En esta tesina se presenta información actualizada sobre la Fertilización in Vitro (FIV) en bovinos, que es una tecnología que permite una difusión más rápida en el ganado de la superioridad genética de animales seleccionados o sea en menos tiempo y con mayor eficacia que con otros métodos de biotecnologías reproductivas. Se hace una descripción de la anatomía y fisiología del sistema reproductor de los bovinos con el fin de comprender los procesos de obtención de gametas y los procesos de embriogénesis, para lograr aumentar el rendimiento reproductivo, para lo cual es necesario conocer la anatomía y respetar la fisiología reproductiva con el fin de obtener los mejores resultados posibles en términos de embriones viables. Se describe el funcionamiento de los equipos y aparatos que se utilizan y el material descartable. Se explica además el proceso de formación y desarrollo de un embrión, la incubación in vitro y la siembra del mismo en una hembra receptora adecuadamente preparada.

1.2 Abstract

In this dissertation, bovine in Vitro Fertilization(FIV) updated information is presented, which is a technology that allows a fastest diffusion in won of selected animals with genetic superiority, that is in less time or more efficiency than with others reproductive biotechnology methods. A description of the anatomy and physiology of bovines reproductive systems is done, in



order to understand the gametes obtaining process and the embryogenesis process to get an increase in reproductive performance. For that reason it is necessary to know the anatomy and respect the reproductive physiology, aiming to get the best possible results with viable embryos. A full description of the equipment used and disposable material is described. Besides it explains the formation process and embryo development, in vitro incubation and its sowing in a properly prepared receptive female.

2. Objetivo general

Recopilar la información más relevante y actualizada sobre la fecundación in vitro en bovinos, los procesos de extracción y capacitación espermática así como los procesos de recolección y maduración de ovocitos, el cultivo de los embriones y el proceso de criopreservación e implantación del embrión.

Se espera que este trabajo sirva de ayuda a los actuales y futuros estudiantes de medicina veterinaria, veterinarios y también todo personal técnico que se dedique a la fecundación in vitro en bovinos.

Difundir los avances y las limitaciones que tiene la biotecnología reproductiva, tales como la propia fecundación in vitro y todos los procesos que se le realizan a los gametos por separado para realizar el procedimiento de la fecundación in vitro en bovinos con total conocimiento.

3. Introducción

Como tema de esta actualización hemos elegido a la Fertilización in vitro (FIV) porque se ha convertido en la herramienta biotecnológica reproductiva de elección en los últimos años, por varias razones. La producción de embriones in vivo, por ejemplo con protocolos de transferencia embrionaria tradicional, se ha estancado en el mundo entero en una producción de alrededor de 5 embriones aptos por cada protocolo reproductivo aplicado, y como deben pasar dos meses entre la aplicación de un protocolo y otro al mismo animal, en definitiva rinde 10 o 12 crías nacidas vivas por año.

Además un número importante de hembras no responden a los tratamientos de superovulación y deben estar en perfectas condiciones



ginecológicas y con absoluta integridad de sus circuitos reproductivos, lo que no tiene mayor importancia para un protocolo de FIV. Con este procedimiento se pueden obtener embriones viables a partir de ovocitos obtenidos de hembras prepúberes, de hembras recién paridas (respetando el puerperio), de hembras con preñeces menores a 3 meses, de hembras con problemas de fertilidad, y sin utilizar gonadotropinas, o sea que no interfiere con los momentos productivos o reproductivos de la hembra seleccionada, entre otras razones. con todo, la razón más contundente es la mucho mayor producción de embriones viables que se pueden obtener con este procedimiento.

Para tener una idea del potencial de las biotecnologías reproductivas más usadas en el mundo, se puede estimar que con la inseminación artificial se puede obtener un ternero por año, con un protocolo de transferencias embrionarias un ternero por mes, y con la FIV se puede obtener un ternero por semana.

El objetivo de este trabajo es reunir información esencial para describir la técnica de FIV, sus beneficios y las grandes mejoras que aporta a la producción bovina. Es una herramienta poderosa que permite mejorar cualidades tanto carniceras como lecheras de los bovinos y por lo tanto provee al productor ganadero mejores rendimientos de sus animales. Esta tesina aspira a brindar a estudiantes y veterinarios información confiable y precisa sobre la adecuada utilización de esta tecnología.

4. Metodología

La tesina se basa en la recopilación de material bibliográfico de trabajos científicos publicados en revistas con jurados, libros, manuales, artículos de divulgación, trabajos de tesinas, tesis, presentaciones en jornadas y congresos, consultas con veterinarios especializados y centros de producción de genética bovina. Con estos métodos creamos esta presentación que presenta lo indispensable de esta tecnología y se analiza su aplicación en condiciones de campo.

5. La fertilización in vitro



El proceso de fertilización in vitro consiste básicamente en la extracción de ovocitos de una hembra bovina, la maduración de esos ovocitos y la fecundación con espermatozoides de un toro con la finalidad de generar embriones que luego de ser incubados durante unos días serán implantados en hembras bovinas receptoras. Este proceso permite obtener varios embriones de una sola vaca, debido a que con el procedimiento de recolección de ovocitos de una hembra bovina nos permite obtener una cantidad promedio de 4 a 7 ovocitos, por lo que nosotros estamos acelerando un proceso que tarda 4 a 7 años en una vaca con inseminación artificial o monta natural debido a que las vacas pueden tener un solo ternero por año, sumado a que de cada vaca se puede extraer ovocitos cada 21 días cada vez que esté ovulando.

Con los toros se aplica también un proceso de extracción de semen y de capacitación in vitro de los espermatozoides, procedimiento que se realiza in vivo dentro del aparato reproductor de la hembra. Como se utiliza semen congelado para la FIV, los espermatozoides no están capacitados porque no ingresaron al tracto genital femenino, por lo tanto deben capacitarse. La capacitación se hace in vitro para poder inseminar a los ovocitos que estarán en un ambiente artificial (placa de Petri) dentro de una incubadora que imita el ambiente uterino de modo que se puedan obtener ovocitos fertilizados que luego se cultivan hasta el estado de mórula o blastocisto, con una edad de 6/7 días.

Para sembrar esos embriones la hembra debe estar en diestro, o sea que esté en el día 7 del ciclo sexual, estado adecuado para la implantación del embrión y su consecuente desarrollo. En el día 3 después de la ovulación en una preñez fisiológica el embrión ya fecundado en la ampolla del oviducto desciende para implantarse en el cuerno uterino alrededor del día 10 del ciclo sexual. El estado de desarrollo del embrión en el momento de la siembra en una hembra recipiente es el estado de mórula o blastocisto.

6. Descripción anatómica y fisiológica del aparato reproductor de la hembra bovina



El aparato reproductor de la hembra bovina está conformado por un conjunto de órganos relacionados entre sí, a los que podemos dividir en órganos internos y externos. Dentro de los órganos internos se incluyen dos ovarios, dos oviductos, útero, cérvix, vagina y vestíbulo y como genitales externos la vulva, el clítoris y las glándulas mamarias(23,4).

6.1. Ovarios

Los ovarios son los órganos principales del aparato reproductor femenino. Cada hembra posee dos ovarios que se encuentran ubicados a los costados de los cuernos uterinos.

En la vaquillona los ovarios se encuentran en la cavidad pelviana junto al útero y miden 1 a 2 cm. En la vaca adulta se encuentran en la cavidad abdominal y miden 3 a 4 cm

Los ovarios tienen dos funciones: la producción de ovocitos, o sea la gameta femenina, y la producción de hormonas, principalmente estrógenos y progesterona, durante los distintos estadios del ciclo estral. En la superficie del ovario se pueden encontrar dos estructuras diferentes: folículos y cuerpos lúteos. Usualmente se pueden encontrar varios folículos en cada ovario, que varían en tamaño desde apenas visibles, hasta 20 mm en diámetro(23, 4).

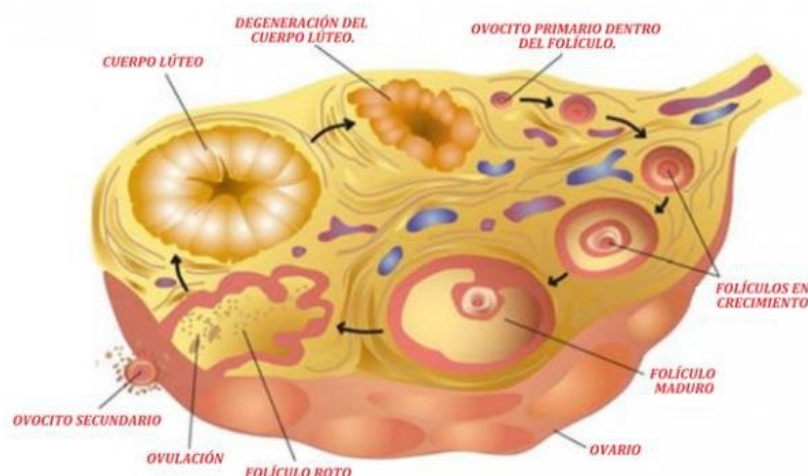


Imagen 1. Representación gráfica de un ovario con distintos desarrollos de folículos



(Gonzales K)



6.2. Oviductos

Están conformados por dos aberturas, una anterior o abdominal y otra posterior o uterina y cuatro porciones: la primera rodea o envuelve al ovario (infundíbulo) total o parcialmente, según la especie animal considerada, extendiéndose en sus siguientes porciones (ámpula o ampolla e istmo) hasta las puntas de los cuernos uterinos(4). Sus funciones son la del transporte de los oocitos, favorecer la maduración de los mismos y alojar a los espermatozoides, así como la de proveer el sitio propicio donde se lleva a cabo la fertilización(23).



Imagen 2. Representación gráfica del oviducto.

(infovets)

6.3. Útero y cuernos

El útero consta de un cuerpo y dos cuernos (derecho e izquierdo); su interior está recubierto de una membrana mucosa, llamada endometrio con abundantes glándulas simples, excepto en las carúnculas que no son glandulares. Las carúnculas son proyecciones de la superficie interna del útero, donde se fijan, por medio de los cotiledones, las membranas fetales durante la gestación. El cuerpo del útero se bifurca en dos cuernos y es en uno de estos donde se va a implantar el embrión y se va a desarrollar el feto durante el período de gestación. Las carúnculas durante la preñez aumentan su tamaño(23,4).

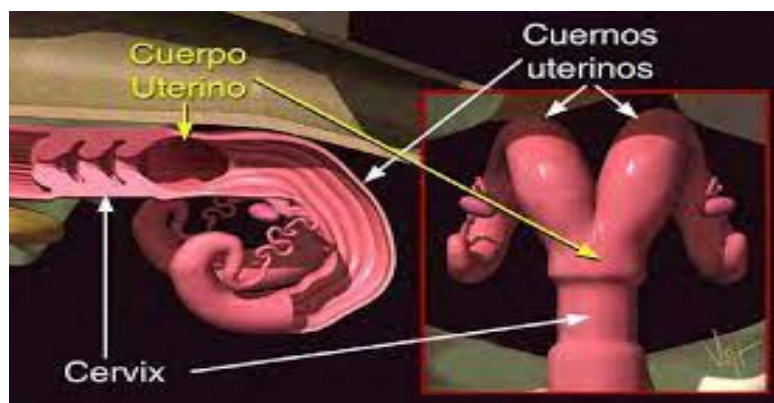


Imagen 3. Representación gráfica de cuernos, cuerpo y cuello del útero (cérvix).

(DeJarnette M)

6.4. Cérvix

El cérvix es un órgano de paredes gruesas, que establece la conexión entre la vagina y el útero. Está compuesto de tejido conectivo denso y músculos; consta de 3 o 4 anillos cartilagosos alineados casi paralelos, y es nuestra referencia al inseminar una vaca. La entrada al cérvix está proyectada hacia la vulva en forma de cono. Esto forma un círculo ciego de 360° que rodea completamente la entrada al cérvix. Esta base ciega del cono es conocida como fórnix. El diseño le facilita al cérvix ejercer su función principal, que es la de proteger el útero del medio ambiente exterior. El cérvix se abre hacia adelante al cuerpo uterino. Mide de 8 a 10 cm. Entre sus principales funciones están las de facilitar el transporte de los espermatozoides hacia la luz del útero mediante la producción de moco, actúa como reservorio de espermatozoides y durante el celo, la musculatura lisa del cérvix se relaja bajo la influencia de estrógenos(17,23,4)

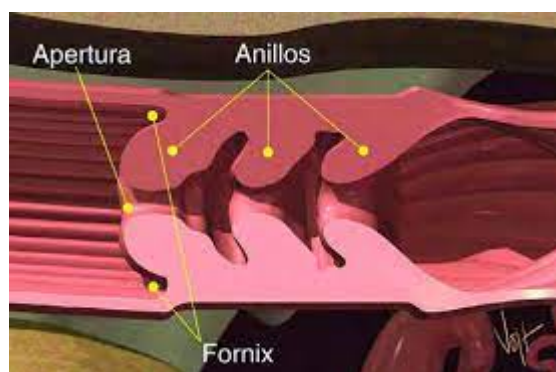


Imagen 4. Representación gráfica del cérvix.

(DeJarnette M)



6.5 Vagina

Está ubicada horizontalmente y paralela al recto, por encima de la vejiga. El tamaño de la vagina es aproximadamente de 25 centímetros, de acuerdo al desarrollo corporal y al estado reproductivo de la hembra(4). Las paredes de la vagina son elásticas y sensibles a los cambios hormonales y segregan una sustancia lubricante durante el parto y en los períodos de celo o calor. La vagina está localizada dentro de la cavidad pélvica, entre la vulva y el cuello del útero(17).

6.6 Vulva

La vulva es la parte más extrema del aparato reproductor y está formada por los labios vulgares derecho e izquierdo, los cuales miden aproximadamente 12 cm de longitud. Tiene tres funciones principales: dejar pasar la orina, abrirse para permitir la cópula y ser parte del canal de parto. En la comisura ventral de la vulva se encuentra el clítoris, el cual es el homólogo del pene(23,17,5).

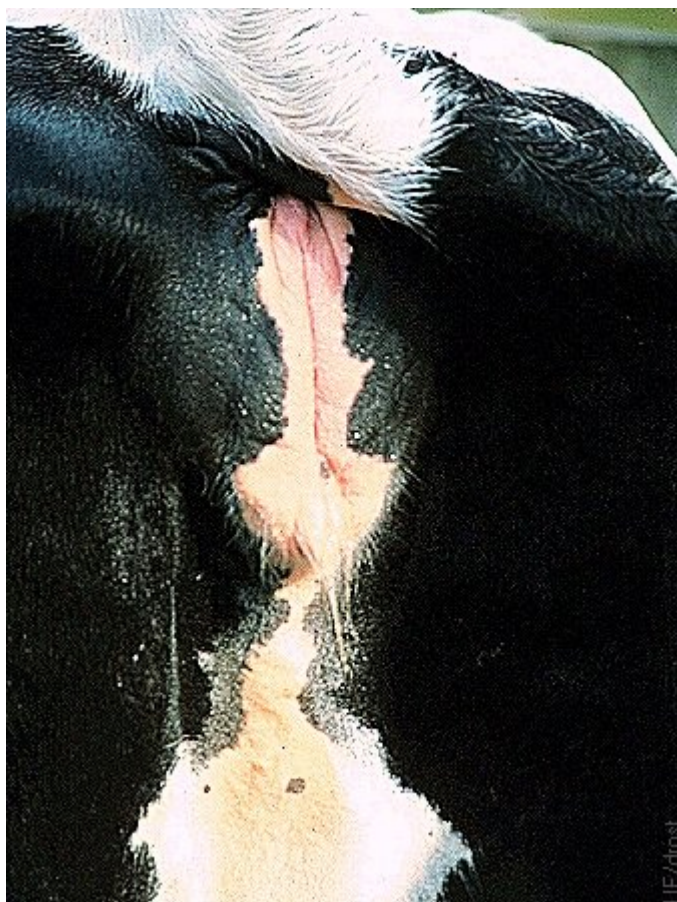


Imagen 5.Figura de la vulva de la vaca.

(VisGar)

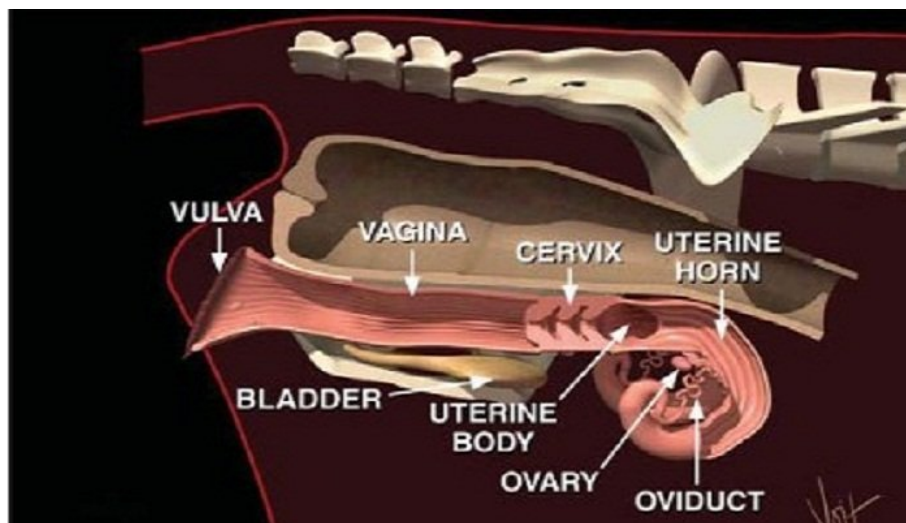


Imagen 6. Representación gráfica del aparato reproductor de la hembra bovina. (Gonzales K)

Tamaños normales de los órganos de la hembra bovina

ÓRGANOS	TAMAÑO
Vulva	12 cm de largo
Cuernos del útero	35-45 cm
Cuerpo del útero	1-3 cm
Cérvix	8-10 cm
Oviductos	25 cm
Ovarios	3-4 cm de largo y 2cm de grosor

(23)

7.Ciclo estral

La hembra bovina se puede clasificar como poliéstrica anual o no estacional lo que quiere decir que tiene ciclos estrales durante todo el año actividad cíclica tiene una duración que varía entre 17-25 días (21 días promedio). Se considera que un ciclo estral inicia con el estro o celo (día 0), y concluye con el siguiente estro. Comprende una serie de eventos predecibles



de índole ovárico, endocrino y conductual recurrentes con la finalidad de que ocurra la ovulación, el apareamiento y la gestación. La fertilización del óvulo se da en el oviducto. El blastocisto llega al útero alrededor del día 5. La gestación dura 279-290 días(4,41).

El ciclo consta de dos fases dependientes de las estructuras ováricas y del ambiente hormonal que éstas generan: la fase folicular o estrogénica y la fase lútea o progestacional(4,41).

La fase folicular: inicia con la regresión o luteolisis del cuerpo lúteo anterior y finaliza con la ovulación. En general, su duración es corta, comprende alrededor del 20% del ciclo. Durante esta fase ocurre la maduración folicular por lo que el esteroide gonadal dominante es el estradiol (E2). En esta fase la gonadotropina hipofisaria dominante es la hormona foliculoestimulante (FSH), y la ovulación es causada por un pico de la otra hormona hipofisaria que es la hormona luteinizante (LH)(4,25,41).

La fase lútea se inicia con la ovulación seguida de la formación del cuerpo lúteo o amarillo funcional hasta su luteolisis o regresión por lo tanto, la hormona dominante es la progesterona (P4). La duración de esta fase es de aproximadamente 14/15 días. Durante la fase lútea los folículos continúan su desarrollo pero sin producir altas concentraciones de E2. Esta fase comprende alrededor del 80% del ciclo(4,25,41).

A su vez, estas fases pueden ser subdivididas en etapas bien definidas de acuerdo a las características endocrinas y conductuales que manifiestan los animales:

- Proestro y estro en la fase folicular.
- Metaestro y diestro en la fase lútea.

7.1 Estro:



También llamado calor o celo, es la etapa caracterizada por un periodo de receptividad sexual en donde la hembra acepta la monta y el apareamiento. Debido a que ésta es la etapa más fácilmente reconocible por la conducta que muestra la hembra, se le considera el inicio del ciclo estral (día 0), corresponde al primer día del estro cuya duración es de 15 h promedio con un rango de 06-24 h aproximadamente, variando según la edad, la raza y estado nutricional(25).

7.2 Metaestro:

Esta etapa principia cuando ha terminado la receptividad sexual y concluye en el momento que hay un cuerpo lúteo funcional bien establecido. En el metaestro temprano tanto las concentraciones de E2 como de P4 están relativamente bajas. Dura de 3-5 días y en ella ocurre la ovulación 28-30 h después del día 0.(4,25,41)

7.3 Diestro:

Es la etapa más larga:su duración es de 10-14 días,y este rango va en relación con el tamaño y el tiempo que el CL permanezca funcional hasta la regresión del mismo (días 16-17 del ciclo aproximadamente) (3,24,40)

7.4 Proestro:

Esta etapa está determinada por el grado de desarrollo en el que se encuentre el folículo dominante, la cual tiene un rango de 2-3 días, el final de esta etapa coincide con el inicio de la receptividad sexual, es decir el estro con lo que se cierra el ciclo(4,25,41).

8. Crecimiento folicular

El crecimiento y el desarrollo folicular se caracterizan, en los rumiantes, por dos o tres ondas foliculares consecutivas por ciclo estral. Cada onda implica el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos de la reserva ovárica total y la selección de un folículo dominante, que sigue creciendo y



madurando hasta alcanzar la fase preovulatoria, mientras que los otros se atresian(4,41).

Se pueden distinguir tres fases distintas en el desarrollo folicular: reclutamiento, selección y desviación o dominancia(4,41).

Cada onda consiste en el reclutamiento simultáneo de entre tres y seis folículos que crecerán hasta tener un diámetro mayor de 4–5 mm. Al cabo de unos pocos días del inicio de una onda surge un folículo dominante, que sigue creciendo y diferenciándose, mientras que sus folículos hermanos dejan de crecer y se atresian. El folículo dominante de la primera onda (en el caso de los ciclos de dos ondas) y de la primera y segunda onda (en los ciclos de tres olas) sufren una regresión(4,41).

9. Grupo activo sexualmente

La hembra presenta determinadas conductas y signos que indican que está entrando en el proestro: se agrupa con otras vacas que están en la misma condición, se frotan, giran, hacen amagues de montarse, y se topan. Este grupo de vacas se llama “grupo sexualmente activo”. Este estado dura 2 a 3 días y luego comienza el celo(4,34,41)

El signo más confiable de una vaca en celo es el comportamiento de permitir la monta, que es el momento en que se deja montar por otro animal del rebaño. Cada episodio de este comportamiento de pasividad a la monta puede durar de 4 a 6 segundos. Las vacas en promedio se montan 1.5 veces por hora y cada celo es visible por aproximadamente 6-8 horas, aunque su duración completa es de aproximadamente 12 horas. De manera que las vacas están en celo un poco más de un tercio del día y solo pasan un total de 3 a 5 minutos montándose(4,34,41)

Otros signos de celo dentro de lo observable son descarga de mucosas claras, descanso de la babilla en la grupa de otras vacas (reflejo de la babilla o papada), vulva edematizada y de color rojizo (hiperémico), grupa fangosa o sucia y cola fruncida, lacerada o raspada en su base, lo que indica



que otras vacas han estado posando sobre su tren posterior produciendo estas alteraciones, más mugidos frecuentes, comportamiento ansioso y comportamiento de olfateo(4,34,41).



Imagen 7. Figura de una vaca montando a otra vaca en estro.

(Contexto ganadero)

10. Pubertad:

La edad del primer celo o pubertad es afectada por la nutrición, la edad y la estación del nacimiento, y oscila entre 7 y 18 meses, con una media de 10 meses. Hay diferencias raciales y de especie. La edad, la alimentación, los problemas climáticos, el ambiente, el manejo, los animales con los que convive la hembra, la presencia cercana de machos, todo eso influye en el comienzo o retraso de la pubertad. Una vez que la pubertad culmina, la actividad cíclica persiste, excepto durante la preñez, durante 3 a 6 semanas después del parto (puerperio), en vacas de alta producción de leche (especialmente si hay alguna evidencia de insuficiencia dietética), y con una serie de condiciones patológicas (4,41)



11. Descripción anatómica del aparato reproductor del macho bovino

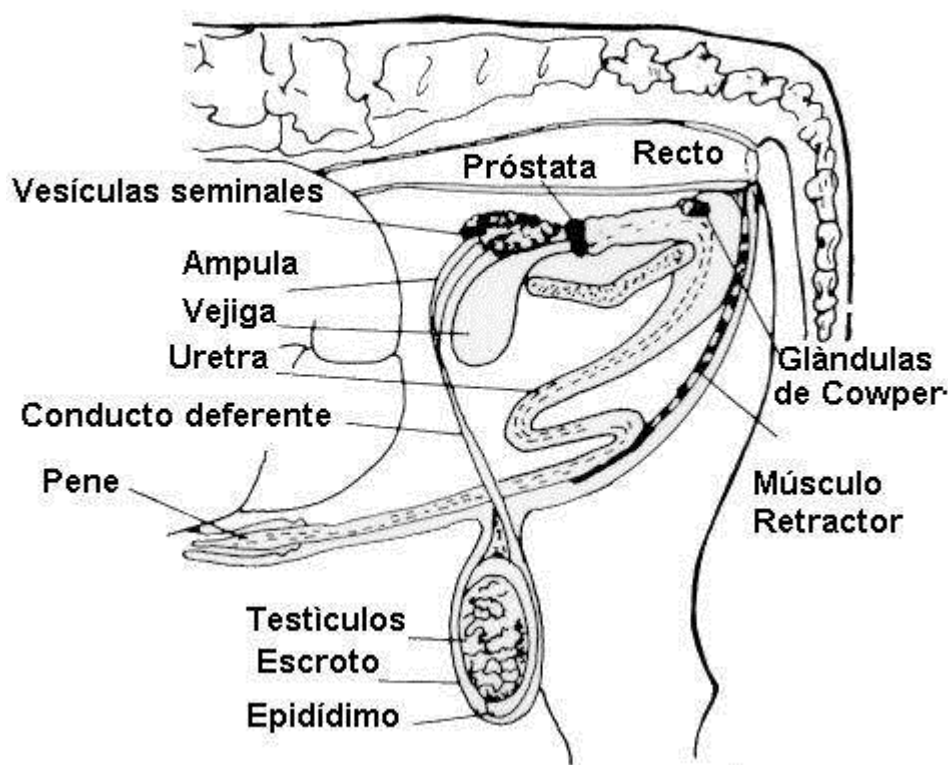


Imagen 8. Representación gráfica del aparato reproductor del toro.

(Gonzales. K)

11.1 Los testículos

Los testículos o gónadas masculinas son glándulas endocrinas y citógenas, son estructuras anatómicas ovaladas que se encuentran ubicadas por fuera de la cavidad abdominal. Estos se hallan recubiertos por una bolsa de piel suave y vellosa llamada “escroto”(4).

La función de los testículos, es la de producir células sexuales o reproductivas masculinas; además tienen la función de producir andrógenos o sea hormonas masculinas como testosterona y pequeñas cantidades de la hormona estrogénica. La hormona testosterona es la que le da las características fenotípicas al macho(41).



Los testículos constan de una masa de tubos seminíferos, rodeados de una capa fibrosa llamada túnica albugínea, de la cual salen estructuras que forman una red de soporte. En este tejido conectivo se hallan las células de Leydig que son las encargadas de producir andrógenos como la hormona testosterona (24).

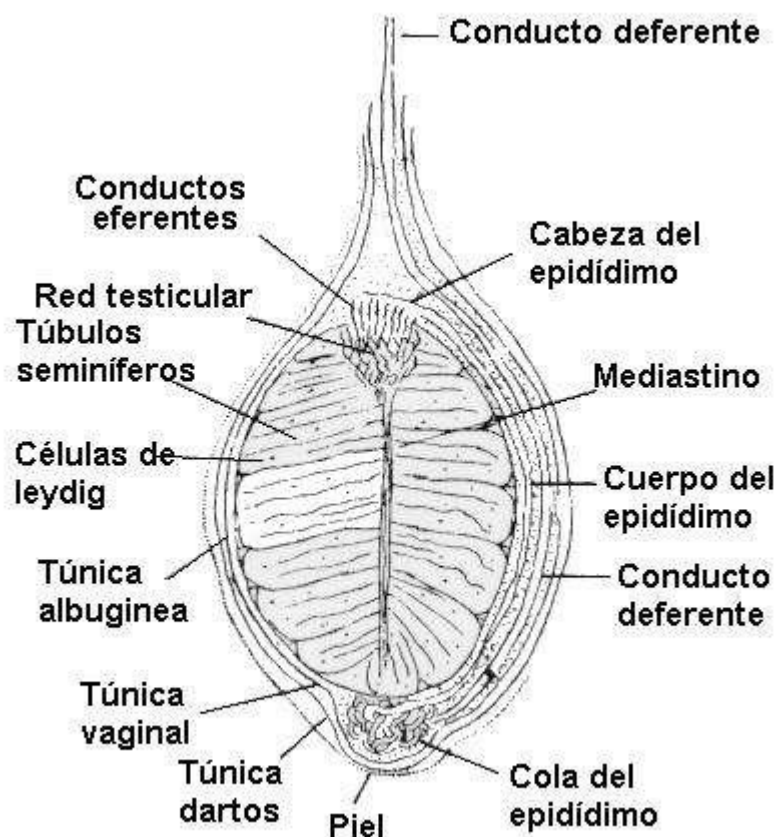


Imagen 9. Representación gráfica del testículo del toro.

(Gonzales K)

11.2 Epidídimo

El epidídimo es un conducto espiralado conformado por tres partes: cabeza, cuerpo y cola; se haya adherido a los lados y los extremos de los testículos. Su función es la de permitir la maduración de los espermatozoides y al mismo tiempo servir de lugar de almacenamiento de los mismos. En los bovinos la cabeza del epidídimo está en el polo dorsal del escroto (24).

11.3 Conducto deferente



Los conductos deferentes son tubos que van desde la cola del epidídimo hasta la uretra y su función consiste en transportar los espermatozoides desde el epidídimo hasta el exterior (uretra)(41).

11.4 Uretra

Esta estructura forma parte del aparato urinario y a su vez sirve de conducto para el plasma seminal, por esta razón incluimos la uretra dentro del tracto reproductivo masculino(41).

La uretra es un tubo o conducto que va desde la vejiga hasta el exterior, circulando por el interior del pene. Su función es común para el aparato urinario y el aparato reproductivo, al permitir la salida de la orina y de semen al exterior(24).

11.5 Glándulas sexuales accesorias

La función de estas glándulas es la de producir el plasma seminal donde se conservan los espermatozoides, los nutre y les da energía, o sea que adquieren movilidad al tomar contacto con el plasma seminal, y les sirve a su vez de vehículo para su salida a través de la uretra. Estos líquidos le dan volumen al semen y además le aportan nutrientes y protección.

En el bovino encontramos tres glándulas accesorias que son la próstata, glándulas bulbouretrales y glándulas vesiculares(24).

11.6 Próstata

Esta glándula está ubicada cerca del cuello de la vejiga, y su función consiste en producir líquidos alcalinos con el fin de neutralizar la condición ácida de la uretra y de la vagina(41).

11.7 Glándulas bulbo uretrales o de Cowper

Están situadas a cada lado de la uretra; su función es similar a la de la próstata y los líquidos secretados por ellas sirven de vehículo al espermatozoide(41).

11.8 Glándulas vesiculares



Son dos y están situadas a ambos lados del cuello de la vejiga, sobre la próstata y dirigidas hacia adelante. Tienen una longitud aproximada de 8 a 10 centímetros, son de forma lobulada y secretan un líquido rico en azúcares como fructosa y ácido cítrico(24).

11.9 Pene

Es el órgano de la copulación, tiene una estructura muscular que lo fija en su parte posterior a la pelvis. El pene desciende por debajo de la pared abdominal y forma una S(flexura sigmoidea) para luego salir por el prepucio(4).

El interior del pene está formado por el tejido cavernoso el cual permite almacenar suficiente cantidad de sangre para producir la erección. A lo largo del pene va la uretra hasta la punta o glándula. La uretra da salida a la orina y cuando el toro cubre a la vaca y el pene está erecto, da salida al semen o eyaculado. El pene tiene una gruesa cobertura elástica que es la túnica albugínea(24).

11.10 Prepucio

El prepucio es el saco externo que cubre la porción libre del pene, recubierto internamente por tejido mucoso y externamente por la piel(24).

12. El semen y sus características

El producto eyaculado por el reproductor es el semen, y está constituido por dos fracciones(5,24,41).

1) Los espermatozoides formados en los testículos y almacenados en el epidídimo

2) El plasma seminal secretado por las glándulas accesorias.

El eyaculado de un toro adulto presenta un volumen que puede variar entre 3 y 12 centímetros cúbicos, de color blanco mate y consistencia



cremosa. La concentración normal del semen puede variar entre 500 y 2.000 millones de espermatozoides por centímetro cúbico. Esta característica del semen es la que permite que se pueda diluir en soluciones especiales (diluyentes), con el objeto de ser utilizado en varias hembras mediante **inseminación artificial** o en FIV(5,24,41).

12.1 Espermatozoide

También llamado gameto masculino, espermatozoo, zooespermio, de tamaño microscópico, consta de acrosoma, cabeza, pieza intermedia o cuello, y cola o flagelo (24). El espermatozoide tiene una propiedad esencial para cumplir con su función: es móvil. Posee 3 clases de movimientos: a) Motilidad rectilínea y progresiva (MRP) que es la cualidad que le permite atravesar en minutos toda la longitud del aparato reproductor femenino, b) Movilidad circular, que como su nombre lo indica lo hace girar en círculos, y c) Movilidad oscilatoria, que lo hace moverse a un lado y a otro sin desplazarse. Para poder fertilizar un ovocito es fundamental que el espermatozoide esté completo, sin alteraciones de ningún tipo.

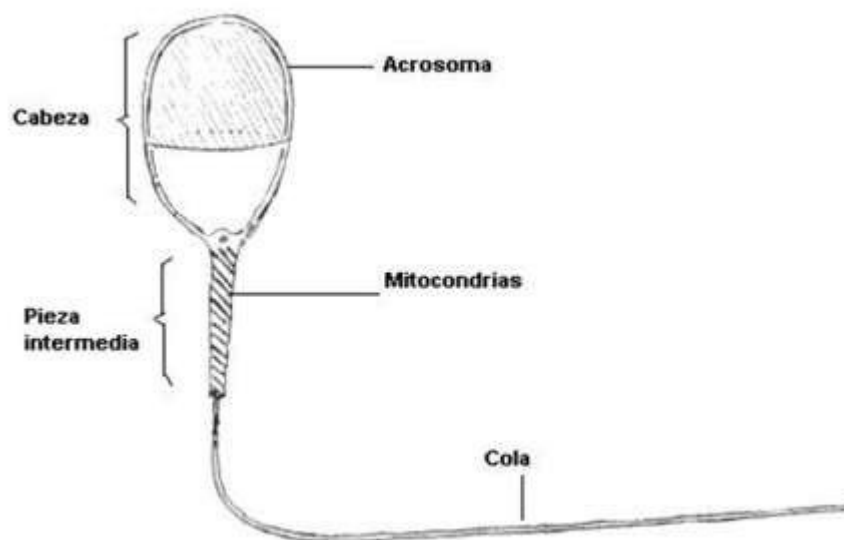


Imagen 10. Representación gráfica del espermatozoide.

(González K)



13. Pasos de la fertilización in vitro.

Como dicen Filipiak y Larocca en su Manual de Fecundación in vitro la fecundación in vitro se efectúa en distintos pasos que son(16,18,19,20):

1) Recuperación y clasificación de los complejos cúmulus ovocitos (COCs) obtenidos de los ovarios, ya sea de ovarios de mataderos o recuperados de hembras vivas.

2) Maduración de los COCs

3) Fertilización de los ovocitos

4) Cultivo de los cigotos

Los embriones así producidos son cultivados o incubados y al llegar al día 7 de su incubación pueden ser directamente transferidos a receptoras, criopreservados o destinados a la investigación(16).

Hay que señalar que en la técnica de FIV desarrollada rutinariamente en los laboratorios de investigación para la obtención de ovocitos con usos experimentales se usan ovarios de hembras que han sido faenadas en el matadero, los que no tienen prácticamente ningún valor genético(19).

Por supuesto, en los programas reproductivos de mejoramiento genético los embriones producidos in vitro provienen de hembras de alto valor genético(20).

Una técnica que se ha desarrollado en los últimos años es la técnica de obtención de ovocitos mediante punción de los ovarios in vivo guiada por ultrasonido (OPU o ovum pick up) (20)

14. Proceso de obtención de ovocitos

Existen diversas técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas de obtención de gametos femeninos en bovinos, basadas en cirugías, laparoscopías o en



técnicas guiadas por ultrasonografía como la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU-por sus siglas en inglés), así como de ovarios de animales procedentes de mataderos. Todas estas técnicas se remiten a la aspiración del contenido de los folículos y la obtención de gametos inmaduros (complejos cumulus-ovocito COC's) que permiten, dado su estado fisiológico, obtener un alto número y más homogeneidad en los procesos. En el laboratorio, todos los procesos de manipulación de ovocitos son similares y utilizan conceptos del cultivo celular y de la incubación controlada en incubadoras programables. (3,29,33,45)

14.1 Obtención de ovocitos provenientes de ovarios de vacas y vaquillonas del matadero o por ovariectomias.

Los procesos de obtención de ovocitos a través de ovarios de animales de matadero es una de las formas más utilizadas y eficaces. Se han desarrollado métodos para obtener grandes cantidades y de muy buena calidad, tal como describe Alvarado J. Se realiza a partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración manual con jeringa de todo folículo que tenga un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm. Se va aspirando el líquido folicular de esos folículos, se deja decantar, se identifican y se van captando los ovocitos uno por uno. Esta técnica suministra una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo, provenientes de animales en diferentes estados de ciclo estral, que pueden ser madurados, criopreservados, fertilizados y cultivados in vitro hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario(39). Sin embargo, a pesar del potencial que tienen los ovarios de producir ovocitos, la recuperación de ovocitos de matadero es muy limitada e irrepetible (3,33)

Por cada vaca (2 ovarios recuperados) se pueden obtener entre 15-20 ovocitos lo que permitirá obtener 4-6 embriones aptos para ser transferidos (40).

En general los ovocitos obtenidos en el matadero provienen de ovarios de vacas y vaquillonas no preñadas aunque hasta el momento no existe



evidencia que la producción de ovocitos a partir de ovarios con un CL de gestación sea diferente(33).

En el laboratorio los ovocitos son obtenidos por aspiración del líquido folicular y luego son identificados bajo lupa y recogidos para ser madurados en un medio adecuado. Luego de madurados pueden ser inseminados y fertilizados (40).



Imagen 11. Figura del aparato reproductor de la hembra bovina.

(VisGar)

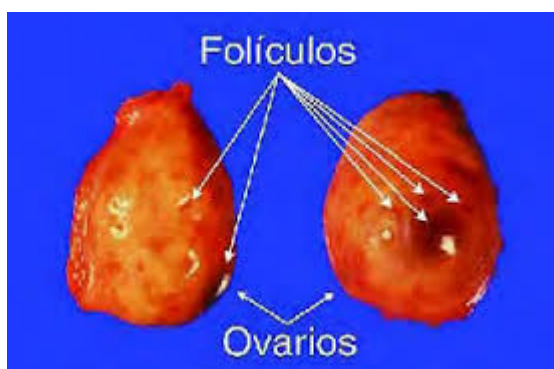


Imagen 12. Figura de los ovarios de la hembra bovina.



(Canaval C)



14.2 Técnica de aspiración folicular (Ovum Pick-Up; OPU)

La técnica de aspiración folicular como señala Pelaez es un procedimiento en el cual se obtienen ovocitos en la hembra viva a partir de punciones transvaginales guiadas ecográficamente (Ultrasound Guided Ovum Pick-Up; OPU) o sea “Aspiración Folicular guiada por Ultrasonido”, y su posterior maduración, fecundación y cultivo in vitro permite la producción de embriones que pueden ser criopreservados o bien transferidos a hembras receptoras(45).



Imagen 13. Figura de ecógrafo utilizado en OPU.

(Productos ganaderos)



Imagen 14. Figura de ovario visto a través de ecografía.

(Pelaez)

Esta técnica permite recoger ovocitos en las hembras de más de seis meses de edad, durante los primeros tres meses de gestación y a partir de las 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de seis meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia(45).

La recolección de ovocitos de animales vivos permite incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora al año, obtenidos por procedimientos in vitro, y además permite la disminución del intervalo generacional y ayuda a establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia productiva(3,33).

La aspiración transvaginal guiada por ultrasonido es la técnica de recolección de ovocitos de hembras vivas más usada actualmente en países como Brasil. La aspiración folicular puede ser repetida en el mismo animal durante 5-6 meses y una periodicidad de dos aspiraciones por semana o una semanal, sin ningún efecto sobre la reproducción o el bienestar animal. Además la OPU se puede aplicar durante los primeros tres meses de gestación a vaquillonas, vacas o terneras prepúberes con lo que se logra hacer más corto el intervalo generacional(3,33,45).



La OPU-FIV permite obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad o mala respuesta a los tratamientos superovulatorios. Se ha demostrado que al final del periodo de aspiraciones los animales pueden retornar a sus ciclos estrales normales y ser incorporados a sus programas de cría(33,45).

La viabilidad de los embriones producidos a partir de los ovocitos obtenidos por aspiración es similar a la alcanzada por embriones producidos por otros procedimientos in vitro, pero un poco más baja que la obtenida para embriones obtenidos por lavado, obteniéndose porcentajes de preñez que varían desde un 25-45 % (40)

“Los pasos para la aspiración folicular (OPU) se pueden resumir de la siguiente manera(6,7,19,21,26,40):

1. La OPU necesita de la tranquilización y la relajación previa del animal. Esta se puede realizar con el animal en pie en un potro de contención, mediante la aplicación de una pequeña dosis de xilacina vía intramuscular al 2%(6,26).



Imagen 15. Figura de instalación utilizada para contener a los bovinos. (Pelaez)

2. Posteriormente, se debe administrar una anestesia epidural “baja”, con la aplicación de un volumen de 5 ml de lidocaína al 2%, para lograr reducir los esfuerzos expulsivos, relajar esfínteres y facilitar la manipulación de los ovarios(40).



Imagen 16. Figura de aplicación de anestesia epidural.

(Pelaez)

3. Vaciamiento del recto, limpieza y desinfección de la vulva y área perineal(6,40).

4. Introducción del transductor en la vagina, convenientemente lubricado y protegido por una cubierta sanitaria de látex(21,40).



Imagen 17. Representación gráfica de la técnica utilizada para la OPU.

(Dpto. de Reproducción Animal y Conservación Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos INIA - Madrid)

Para la visualización de los folículos ováricos empleamos un ecógrafo equipado con una sonda transvaginal de 5 MHz de calibre 18 y un “handgrip” o mango de OPU de 60 cm de longitud donde va colocada la guía de punción. Por la guía se introducirá una aguja de punción desechable (20 G, 0'9 x 70mm) conectada a un tubo estéril de 50 ml mediante una conducción de Teflón. El equipo de OPU se completa con una bomba de vacío accionada a



pedal con la que se aplicará una aspiración constante de 110 mm Hg (20 ml/min). El tubo de recogida debe mantenerse atemperado a 37°C en baño termostático(40).

5. Los ovarios se posicionarán vía rectal delante de la sonda para folículos visibles de más de 3 mm de diámetro. Antes de iniciar la sesión de punción se drenará el sistema aspirando una pequeña cantidad de medio líquido de recogida. Tras la aspiración de 3-4 folículos se realizará un lavado exhaustivo del fluido folicular en la aguja de aspiración y en el sistema de recolección con medio de lavado y recogida [PBS suplementado con heparina sódica (2'2 UI/ml) y SFB (suero fetal bovino) (1%)]. El fluido obtenido de cada animal contenido en un tubo de recogida de 50 ml será inmediatamente filtrado, los restos de sangre serán eliminados por continuos lavados en PBS fresco y se pasará a una placa de Petri para localizar y evaluar morfológicamente bajo estereomicroscopio los complejos cumulus ovocito (COCs) aspirados(21,40).



Imagen 18. Figura de fluido obtenido filtrándose(40).

(Pelaez)



Imagen 19. Figura de búsqueda y clasificación de los óvulos(40).

(Pelaez)

La calidad de los ovocitos es esencial en la eficiencia de la maduración in vitro (MIV), y está relacionada desde su recolección por la cantidad y calidad de las células del cumulus adyacentes, así como por la calidad de su citoplasma. Lo más valorado en las células del cumulus es su cantidad, considerando más de cuatro capas como el número adecuado, así como su posición, la cual se busca que estén rodeando completamente la zona pelúcida. El citoplasma debe de presentar homogeneidad en su coloración marrón (café), por lo que cambios en esa coloración a tonalidades más claras u oscuras, son criterios de descarte asociados a picnosis y degeneración, entre otros. En base a estos conceptos morfológicos, entidades como la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS), han establecido criterios de selección de COC's clasificados en cuatro grados (de I a IV) (21,26,44)

“Clasificaremos los COCs obtenidos en cuatro categorías, según homogeneidad, morfología del citoplasma y compactibilidad de las células del cúmulo(6,16,19,21,26,40):



- Categoría I: Ovocitos con más de tres capas de células del cúmulo compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granulado (18, 39).

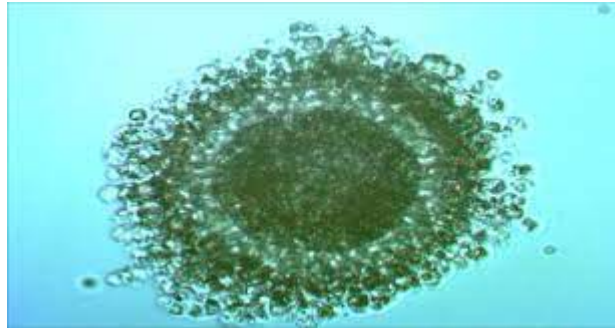


Imagen 20. Figura de ovocito de categoría I.

(Martínez.Y)

- Categoría II: Ovocitos con menos de tres capas de células del cúmulo y citoplasma generalmente homogéneo(6,40).

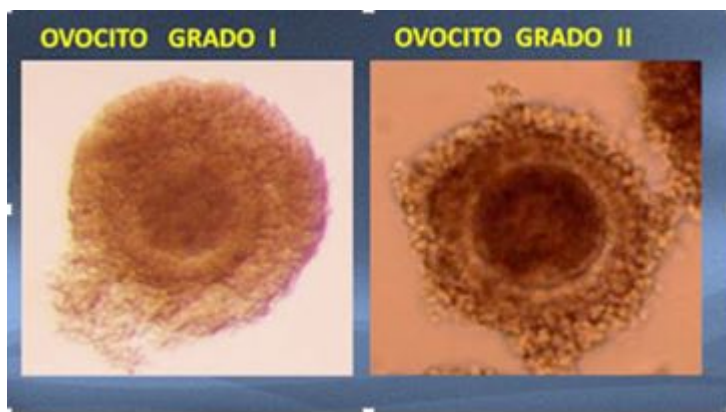


Imagen 21. Figura de ovocitos de categoría I y II.

(MANUAL DE BIOTECNOLOGÍA

REPRODUCTIVA EN BOVINOS)

- Categoría III: Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras(20,40).

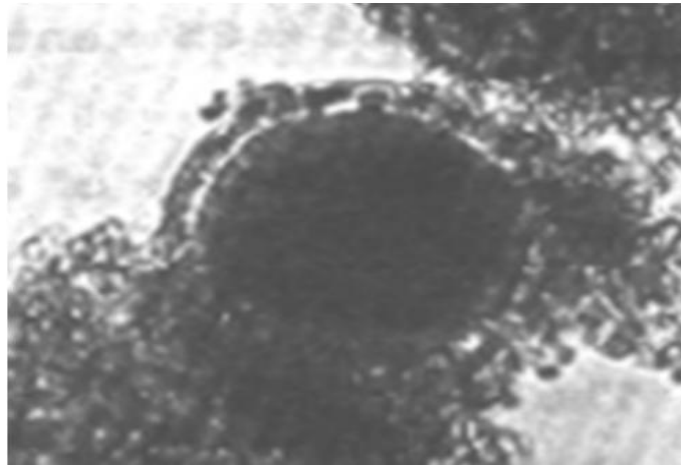


Imagen 22. Figura de ovocitos con pocas células de cumulus (20).

- Categoría IV: Ovocitos desnudos. Ovocitos desnudos(19,39).

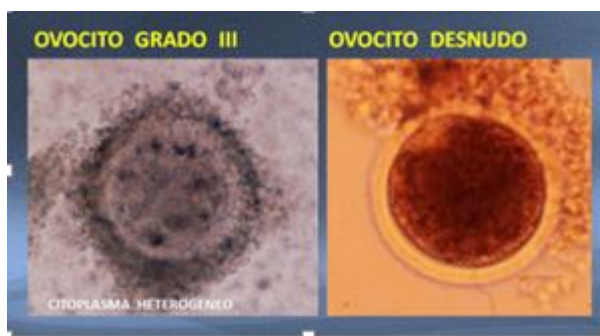
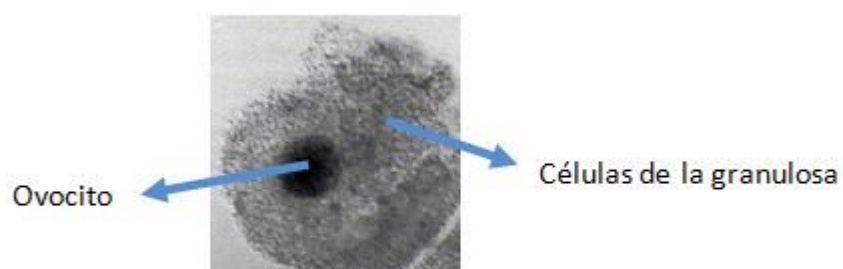


Imagen 23. Figura de ovocitos de categoría III y IV (desnudo).

(MANUAL DE BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA EN BOVINOS)

- Ovocito maduro: Ovocitos madurados in vivo, con cúmulo expandido(19,39).



Complejo cúmulo-corona-ovocito



Imagen 24. Figura de ovocito de categoría V (maduro).

(Instituto Bernabeu)

Ovocito con cumulus expandido. Después de 24h de la maduración.

14.3 Obtención de ovocitos mediante método laparoscópico

El método laparoscópico de recuperación ovocitaria (LOPU) permite obtener ovocitos de los folículos pre-ovulatorios en crecimiento; sin embargo, esta técnica es considerada como invasiva. A pesar que esta técnica permite una clara visión de la superficie ovárica, no permite visualizar la cohorte de folículos en crecimiento por debajo de la superficie ovárica. Los trabajos iniciales de recuperación ovocitaria por vía laparoscópica se los realizaba por abordaje de la fosa paralumbar; sin embargo, estudios posteriores pudieron demostrar que era posible recuperar ovocitos laparoscópicamente por vía vaginal, aunque la técnica fue desarrollada para examinar los órganos reproductivos internos de la vaca a través del fondo de vagina. Estos hechos fueron la base para desarrollar las técnicas de diagnóstico y recuperación ovocitaria por ultrasonografía. En la actualidad el método de aspiración folicular laparoscópica está siendo aún empleado en la especie ovina y caprina(3,14,27,31,56).

14.4 Recolección de ovocitos mediante método quirúrgico

La obtención de ovocitos mediante punción de folículos ováricos por el método quirúrgico consiste en practicar una laparotomía por el flanco en sentido vertical, hasta lograr llegar al ovario y lograr extraerlo. Una vez afuera, se van punzando todos los folículos ováricos que midan de 3 a 10 mm de largo, y se aspira el líquido folicular en el que están flotando los ovocitos inmaduros, una vez realizada la aspiración de todos los folículos, se restituye el ovario a su lugar y se sutura la laparotomía(14,31).

15. Maduración de los ovocitos in vitro (MIV)



La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo, durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de profase de MI hasta el de MII (maduración nuclear). El ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de LH, o bien, cuando es retirado del folículo para llevar a cabo la maduración in vitro. Un periodo de 24h es necesario para que el ovocito bovino complete la maduración nuclear, es decir, alcance el estadio de MII, en el que permanece hasta el momento en que es fertilizado, que es cuando completa la meiosis y se forman los pronúcleos(5,7,8,9,12,14,34).

Además de la maduración nuclear, también es importante que exista una maduración citoplasmática ya que prepara al ovocito para soportar la fertilización y aportar los nutrientes requeridos para el desarrollo embrionario temprano. De manera natural, la meiosis inicia en el ovario fetal, pero se detiene antes del nacimiento, en la profase (PI) de la primera división meiótica; los ovocitos pasan entonces a la etapa reticulada, que es un estado de reposo nuclear y que suele durar hasta que se ovula el primer ovocito en la pubertad. Los ovocitos en reposo o inmaduros tienen un gran núcleo denominado vesícula germinal. La meiosis avanza desde la etapa de vesícula germinal o PI hasta la metafase de la segunda división meiótica en la que se detiene una vez más, dando como resultado un primer cuerpo polar que es expulsado al espacio perivitelino. De la misma manera en la que madura el núcleo se debe llevar a cabo la maduración del citoplasma(8,14,33).

Cuando los ovocitos son aspirados desde los folículos primarios o secundarios, reanudan espontáneamente la meiosis y al ser cultivados in vitro continúan con los procesos de maduración. 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 se produzca en 24hs 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, involucra el uso de medios de cultivo tales como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc), antioxidantes (glutati6n, cisteamina, cistina), factores de crecimiento y



macromoléculas (suero, albúmina), en una atmósfera de 5% CO₂ a 38,5°C y humedad a saturación (14,40).

Como explican Salgado E y Lopera R, la MIV es el proceso contiguo a la extracción de los COC's y se considera el proceso mediante el cual los gametos femeninos adquieren la competencia para ser fecundados. Esto se debe a que los ovocitos recolectados proceden de folículos de poco desarrollo, en fases iniciales de la onda folicular, con tamaños entre 2 y 8 mm. Estos gametos, durante la maduración in vitro (MIV), logran finalizar su desarrollo y llegar al estadio de Metafase dos (MII), donde adquieren su competencia citoplasmática y genética, pasando desde la reacomodación de sus túbulos hasta la pérdida de un juego de cromosomas (haploides). Al ser un proceso secuencial, el éxito de los procesos siguientes (fecundación y desarrollo embrionario) depende en gran parte del desarrollo de los ovocitos madurados in vitro(44).

En condiciones óptimas, cerca del 95% de los ovocitos puede alcanzar la maduración y, de estos, una vez fertilizados, cerca del 80% puede llegar al estadio de dos células; sin embargo, menos de la mitad (30-50%) alcanza al estado de blastocisto siete días después de la fertilización.

La eficacia de la MIV puede verse afectada por factores como: a) la recolección de los gametos, el método de recolección de los COC's, b) la temperatura del transporte, en donde temperaturas demasiado altas o muy bajas afectan la competencia ovocitaria, c) el tiempo de recolección y de transporte de los COC's desde la colecta al laboratorio, en donde tiempos muy altos de procesamiento afectan la viabilidad de los COC's, d) su estadio de desarrollo, en donde óvulos ya maduros además de ser incompetentes para el proceso de MIV, afectan el rendimiento del lote, e) el tiempo de maduración (22-24 horas), f) la composición del medio de maduración y suplementos utilizados, y g) cambios en la osmolaridad, pH, y uso de hormonas o aminoácidos(7,40,44).

En la técnica de MIV existen otros factores que también deben considerarse(44):



- a) el soporte físico (placa, tubo),
- b) modo de colocación del método de cultivo (gota o pozo),
- c) la adición de aceite mineral,
- d) el número de COC's por volumen de medio, y el movimiento.

Entre los sistemas de cultivo para el desarrollo de la MIV se destacan(5,8,12):

a) el cerrado, en donde no se permite el contacto directo con la atmósfera, mediante el uso de un recipiente hermético (mezcla de gases)

b) el abierto, que se realiza manteniendo un intercambio gaseoso continuo. El primero se considera de los más antiguos y al no permitir el intercambio gaseoso permanente, necesario para la maduración de los ovocitos, ha entrado en desuso, mientras que dentro del segundo grupo se encuentran el sistema abierto como tal y el recubierto.

En el sistema abierto se coloca el medio de cultivo en un recipiente que está en contacto directo con la atmósfera (placas petri, cámaras de cultivo, tubos etc.); sin embargo, la gran superficie de evaporación puede elevar el sodio y por consiguiente la osmolaridad. Por otro lado, en el sistema recubierto se cubre el medio de cultivo con aceite mineral para evitar la evaporación del medio y permitir el intercambio gaseoso, aunque el aceite mineral puede favorecer la absorción de suplementos como hormonas. El éxito de la fecundación, división y desarrollo embrionario presenta estricta relación de la competencia adquirida durante la MIV(5,12).

Los medios de soporte más utilizados para la maduración in vitro son el KSOM y el TCM 199, por su gran variedad de componentes iónicos y energéticos, que se correlacionan con el éxito presentado en cultivos de células en varias especies. La suplementación de estos medios de maduración pasa por diferentes sustancias en función del protocolo que se esté implementando. Los principales suplementos en orden de importancia son el suero fetal bovino (FCS o SFB), la albúmina sérica bovina (BSA), factores de crecimiento (IGF y EGF), y hormonas como FSH y LH. Tras el



proceso de maduración, los aspectos de evaluación morfológica más evidentes son la expansión de las células del cumulus y la expulsión del primer corpúsculo polar confirmando el estado de metafase II (12,44)

16. Diferencias entre *Bos taurus* y *Bos indicus*

Las razas cebuinas (*Bos indicus*) son diferentes de las razas europeas (*Bos taurus*) en algunos aspectos de su fisiología reproductiva, incluido el reclutamiento de folículos, el número de ondas foliculares y la ultraestructura de los ovocitos(1,5,9,12,13,27,36,55).

La subespecie *Bos indicus* tiene mayor capacidad de producción de ovocitos en comparación con la subespecie *Bos Taurus* debido a que *Bos indicus* genera tres ondas foliculares comparado a *Bos taurus* que genera solamente dos. Esto permite el desarrollo de mayor número de folículos y en consecuencia un mayor número de ovocitos recolectados(1,5,12,36). Se calcula que en promedio se pueden recolectar 6-8 ovocitos vacas de la subespecie *Bos indicus* y de 4-6 ovocitos en las vacas de la subespecie *Bos taurus* (1,27).

En un estudio realizado por Alaves G donde se evaluaron 3622 vacas (Donantes Holstein: 925; Donantes Senepol: 1055; Donantes Nelore: 1202 y Donantes Dairy Gir: 440) se observó una diferencia entre grupos genéticos para la producción de embriones in vitro, demostrando que las donantes cebuinas presentan un mejor desempeño en FIV. Sin embargo, tanto en razas de carne como de leche, el número de embriones producidos fue mayor en las donantes con mayor número de ovocitos recuperados por OPU, independientemente del grupo genético(1)

Con respecto a la estructura de los ovocitos, los de la raza Brahman (*Bos indicus*) presentan una mayor concentración de lípidos comparado con las razas europeas (*Bos taurus*), lo que resulta en una menor respuesta a la fertilización in vitro, por consiguiente, menores tasas de preñez. Con respecto a los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en las hembras donadoras



bajo las mismas condiciones dietarias, se encuentra un nivel circulante más elevado de colesterol y de triglicéridos en la raza Brahman (*Bos indicus*) comparada con las razas inglesas (*Bos taurus*), lo que afecta directamente la influencia de la cantidad de lípidos encontrados en los ovocitos de ambas subespecies(1.9.12.13.55).

En un trabajo publicado en 2020, Guimaraes et col comparan el desempeño reproductivo en FIV de vacas *Bos taurus* vs vacas *Bos indicus* y encuentran que las hembras índicas tienen mayor tasa de recuperación de ovocitos, mayor número de ovocitos viables y en definitiva mayor número de embriones viables que las razas europeas.(27)

17. Proceso de extracción del semen

Los métodos más empleados que menciona Roman A para recoger semen en bovinos son(44):

- a) método de la vagina artificial
- b) masaje por vía rectal de las glándulas vesiculares y de las ampollas deferentes
- c) electroeyaculación

17.1 Método de la vagina artificial

La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de siete centímetros de diámetro y 35–40 centímetros de largo, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45–46 ° C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, lográndose así la eyaculación(3.44.52).



Imagen 25. Figura de vagina artificial para bovinos.

(Phibro Salud Animal)

Para la monta se utiliza un señuelo que puede ser una vaca, un macho o un maniquí. Antes de coleccionar el semen se debe de tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental(44).



Imagen 26. Figura de toro montando un maniquí para extracción de semen.

(CONtextoganadero)





Imagen 27. Figura de toro montando una vaca para extracción de semen.

(TvAgro Angel J)

Dentro de lo que es el estímulo sexual es conveniente antes de la colección que el toro se excite viendo a otros toros montar, o realizando falsas montas, así una vez que se vaya a realizar la colecta se obtiene mayor cantidad y calidad de semen colectado(3,44,52).

Para contribuir a reducir la carga de gérmenes en el semen, y por razones higiénicas generales, en la mayoría de los centros se recomienda que el operador use guantes de goma que cambiará todas las veces(3,44,52).

17.2 Método del masaje por vía rectal

Esta técnica requiere dos personas, una para efectuar el masaje rectal y otra para colectar el semen. El toro se ubica y mantiene en una manga o prensa. Después de remover completamente las heces del recto Este método consiste, en esencia, aplicar un masaje longitudinal repetitivo hacia delante y atrás, principalmente sobre la terminación de los canales deferentes, de las glándulas vesiculares y de la región de la próstata, introduciendo la mano y el antebrazo en el recto del animal(44).

17.3 Método de electroeyaculación

El método de la electroeyaculación se considera conveniente cuando no es posible usar la vagina artificial, porque el toro no está adecuadamente entrenado. Con éste método se hace uso de un electroeyaculador que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios(3).

Los electroeyaculadores están diseñados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir erección peneana y eyaculación(3).



Imagen 28. Figura de electroeyaculador.

Con la utilización del electroeyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, porque primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha(3).

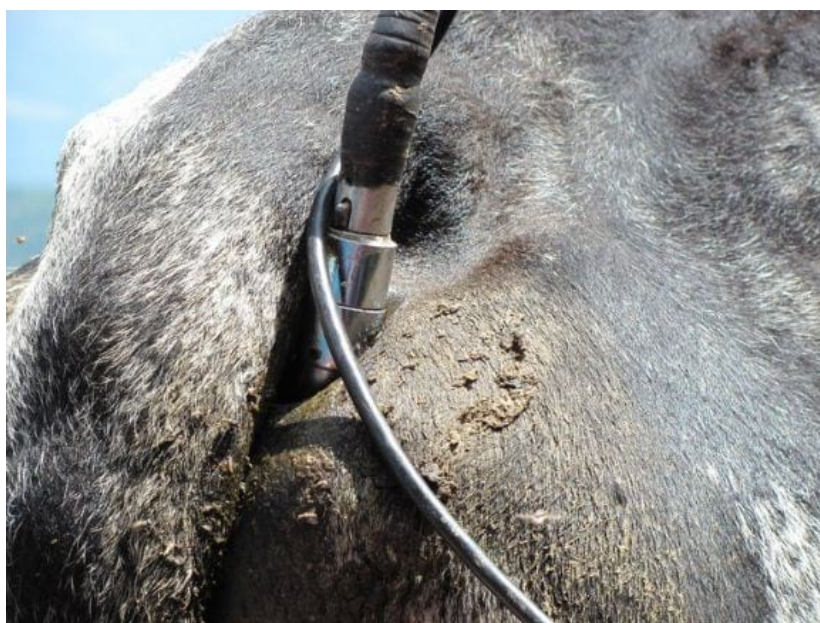


Imagen 29. Figura de electroeyaculador en el recto de un toro.

(Agroveter Market)



18. Proceso de congelación del semen

La congelación del semen bovino ha sido la técnica más antigua y que más ha influido en la difusión del empleo de la IA en la reproducción asistida. Como regla general la refrigeración del espermatozoide es un método sencillo que de manera exitosa ha permitido ampliar el tiempo de viabilidad del espermatozoide, al reducir su tasa metabólica y por lo tanto prolongar la supervivencia del semen mediante la disminución del porcentaje de sustratos empleados y la producción de toxinas(2,3,41).

El éxito de la criopreservación del semen depende de varios factores que interactúan entre sí como el crioprotector, tipo de diluyente, tasa de enfriamiento, tasa de descongelación y empaque, así como la variación individual del reproductor(41).

Con posterioridad a la evaluación de la calidad del semen y realizar el cálculo de la concentración espermática, es importante determinar la cantidad de espermatozoides con Motilidad Rectilínea Progresiva Morfológicamente Normales (MRPMN) en el eyaculado. El número de MRPMN será utilizado para calcular el número de dosis que pueden ser congeladas(2).

Existen dos protocolos para diluir el semen(41):

- A) Protocolo estándar
- B) Protocolo alternativo

Protocolo estándar: El Protocolo Estándar es usado en los Estados Unidos y requiere de dos pasos. Los diluyentes más comúnmente utilizados en este protocolo tienen como amortiguadores el Tris (hidroximetil-aminometano) o el Citrato de sodio.

Requieren de yema de huevo para proteger las células espermáticas contra el shock térmico por frío y vienen presentados comercialmente con dos fracciones (A y B) y una mezcla de antibióticos. La Fracción B es similar



a la Fracción A, excepto que contiene 14% de glicerol como crioprotector. El protocolo de dos pasos logra una concentración final de 20% de yema de huevo, 7% de glicerol, 50 μg de Tilosina, 250 μg de Gentamicina, 150 μg de Lincomicina y 300 μg de estreptomicina por cada ml de semen diluido y congelado.

Protocolo alternativo: El Protocolo Alternativo es un método de un paso. Es el método más empleado en Europa. Está aprobado para ser utilizado con Tris (hidroximetilaminometano) como amortiguador y requiere la adición de 20% de yema de huevo. El diluyente no está fraccionado y contiene 7% de Glicerol más antibióticos. El protocolo produce una concentración de 100 μg de Tilosina, 500 μg de Gentamicina 300 μg de Lincomicina y 600 μg de Estreptomicina por cada ml de semen diluido y congelado.

Una vez diluido y empajuelado el semen (pajuelas de 0,5 ml), se debe llevar a cabo una curva de enfriamiento lenta, la cual se inicia con la refrigeración de equilibrio desde temperatura de laboratorio a 4°C en un período de 4 horas. Luego se procede a la congelación del semen en pajuelas o pajillas mediante el sistema de vapor de nitrógeno líquido a -120 °C, colocando las gradillas con las pajillas a 4 cm sobre el nivel de nitrógeno, contenido en el recipiente para tal efecto, manteniéndose por al menos 10 minutos. Enseguida las gradillas se introducen directamente en el nitrógeno líquido para ser conservadas a -180°C o 196°C(2,3,41).

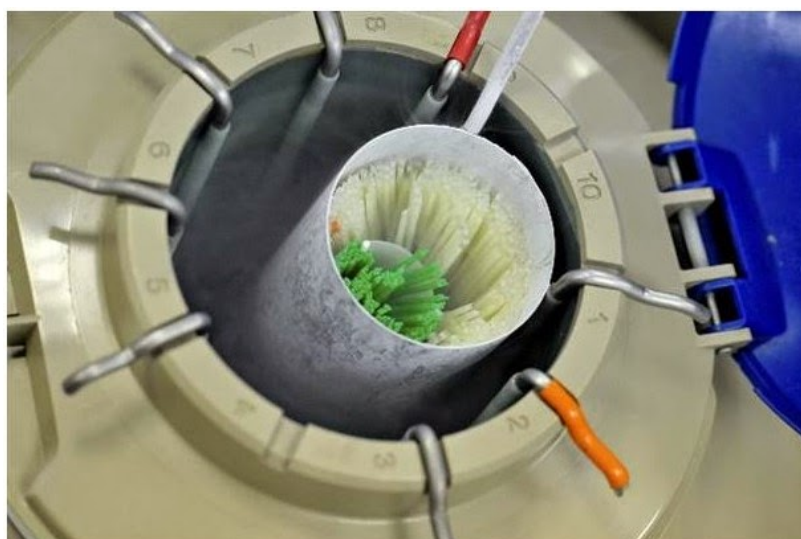




Imagen 30. Figura de pajuelas con semen en el termo de nitrógeno. (Blogger)

19. Proceso de capacitación espermática

La capacitación espermática es el proceso metabólico que sufre el espermatozoide cuando es depositado en el tracto reproductivo de la hembra. Es una reacción en la cual son retiradas las glucoproteínas de la membrana del espermatozoide y que le permite adquirir su capacidad para poder fecundar al ovocito. Es un proceso imprescindible que dura varias horas. La capacitación tiene dos pasos(10,11,44):

A) La remoción del factor descapacitante , que es un factor químico que viene en el plasma seminal y que impide la fertilización porque se une a la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide,y que desaparece en el útero.

B) La activación de las enzimas acrosómicas, es decir que comienza a romperse la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide y a fusionarse con la cromosómica externa para luego disolverse y liberar las enzimas acrosómicas (reacción acrosómica).

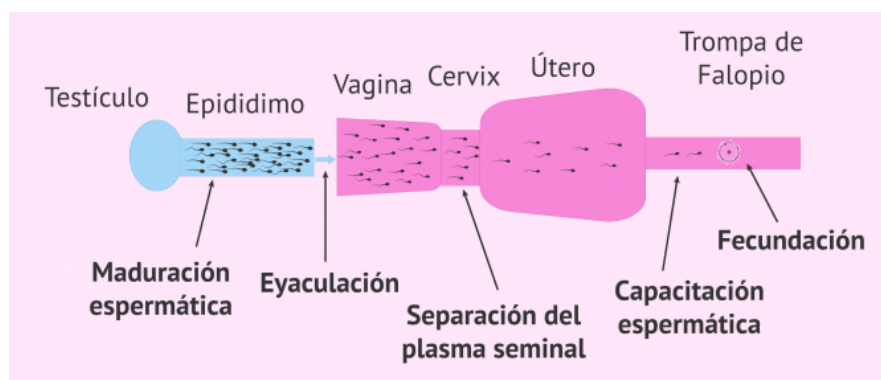


Imagen 31. Representación gráfica del proceso fisiológico de capacitación espermática.

(Reproduccion asistida ORG)



Durante la capacitación ocurren varios fenómenos: los espermatozoides adquieren hipermotilidad progresiva, la capacidad de penetrar el cúmulus y se preparan para que tenga lugar la reacción acrosómica. Cuando se van a utilizar zoospermos para inseminar ovocitos in vitro, deben capacitarse previamente ya que no van a ingresar al tracto reproductivo hembra, y para esto hay varios métodos(10).

Método de Bracket y col (1982): Se cultivan los espermatozoides durante 5 minutos en un fluido de gran fuerza iónica (HIS, 380 mOsm /Kg mas o menos), se lavan, y se llevan a cultivo por 3, 4 o 5 horas. Este tratamiento con HIS fue desarrollado como un medio para retirar el plasma seminal adherido a la superficie de los espermatozoides eyaculados(10).

Método de Hanada y col. (1986): Se diluye el semen agregándole medio de cultivo sintético (que contenga cafeína pero no albúmina sérica bovina) tratado con ionóforo A por un corto periodo ($0.1 \mu M$, por 60 segundos). Posteriormente se provoca la capacitación en un medio de cultivo con albúmina sérica bovina. El ionóforo A ayuda a los espermatozoides a captar los iones Ca y activa la reacción acrosómica, facilitando la penetración espermática al ovocito(10).

Método de Lu y col. (1987): Revisión del método Parrish (1986). Se tratan los espermatozoides congelados con el método swim-up, de uso frecuente en humanos y que consiste en colocar el semen en la parte inferior del tubo de cultivo, dejarlo en reposo y recuperar los espermios activos que hayan alcanzado la parte superior. Posteriormente se colocan en heparina durante 15 minutos para activar la capacitación. El pH del medio de cultivo debe ajustarse a 7.4 para la capacitación y 7.8 para la fecundación, lo que sugiere que el pH afecta ambos procesos(10).

El método swim-up, es una técnica utilizada para seleccionar los espermatozoides más móviles de un eyaculado, que son aquellos que se desplazan con movimientos rápidos y rectilíneos. Esta técnica se basa en el geotropismo negativo de los espermatozoides, por lo tanto tras una



centrifugación alcanzarán primero la superficie aquellos que sean más rápidos y por lo tanto con mayor capacidad fecundante(10).

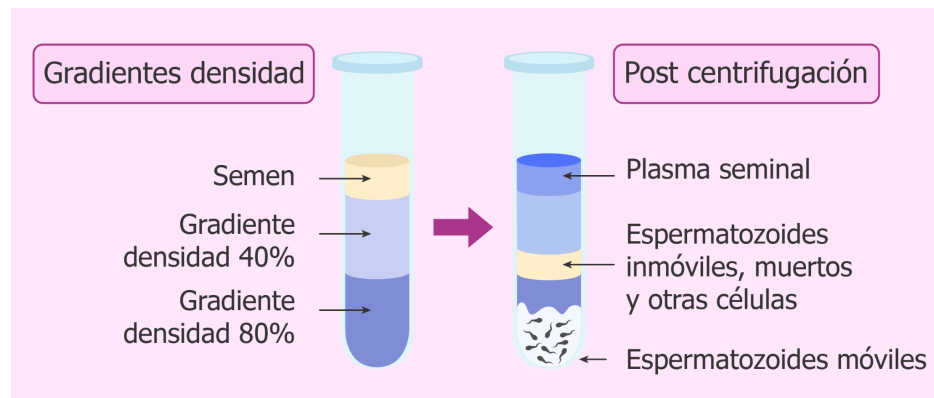


Figura 32. Representación gráfica del contenido seminal post centrifugación.

(Reproduccion asistida ORG)

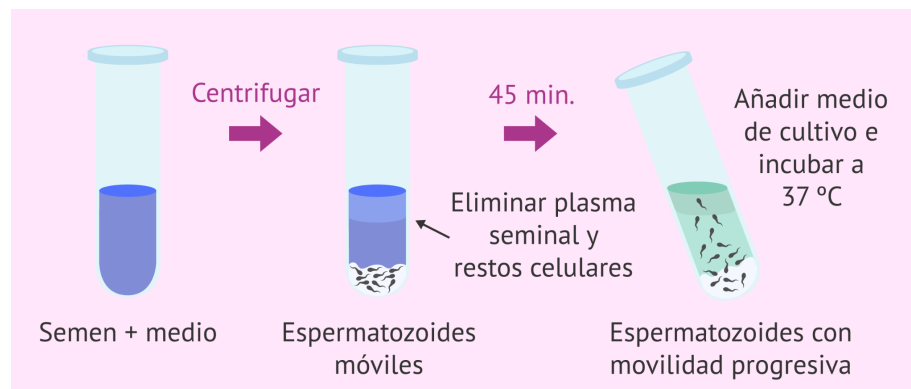


Imagen 33. Representación gráfica de capacitación espermática in vitro.

(Reproduccion asistida ORG)

Método de la universidad de Hokkaido (1995): Los espermatozoides móviles son separados mediante el uso de percoll (45% y 90%) diluido en solución isotónica de Brackett y Oliphant modificada 10 x, centrifugado a 700 xG por 20 minutos y 500 G por 5 minutos. Los complejos cúmulo – oocito son incubados durante 18 horas con la solución de espermatozoides que contiene



teofilina, de modo de obtener una concentración final de 5×10^6 células / ml (10)

20. Fecundación de los ovocitos y cultivo de los embriones

La fecundación de los ovocitos según Gonella D es un proceso en el que se realiza un cocultivo de espermatozoides y ovocitos en un medio que favorece la actividad espermática y penetración de la zona pelúcida. Posteriormente, los embriones obtenidos son sometidos a cultivo en medios que contengan fuentes de energía, aminoácidos y factores de crecimiento, con el fin de mantener su sobrevivencia y desarrollo(22).

La técnica que Pelaez indica consiste en incubar ovocitos maduros con espermatozoides vivos y móviles durante un periodo de 6 a 24 horas (luego de un proceso de selección y capacitación de los mismos) con el fin de formar un embrión.

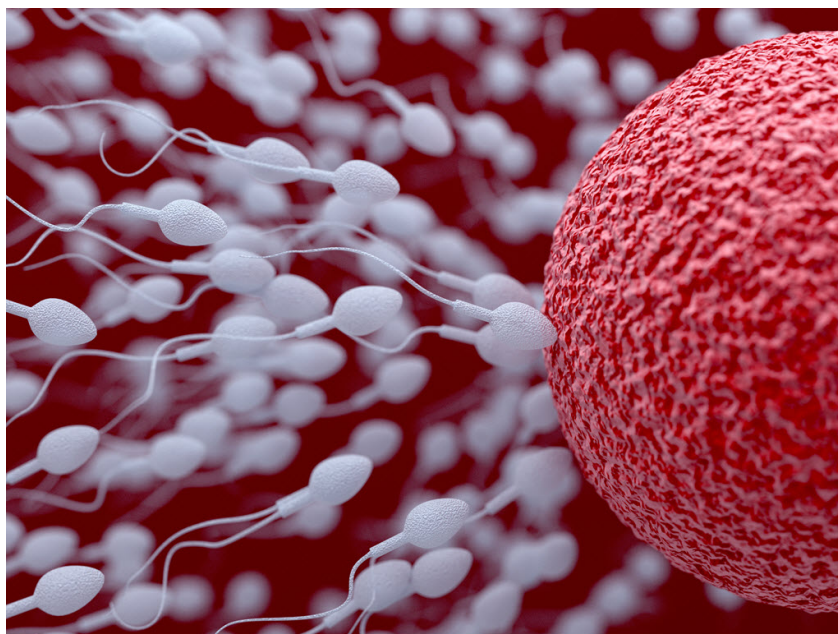


Imagen 34. Representación gráfica de espermatozoides compitiendo para penetrar en el ovocito.

(Instituto CEFER)



La cantidad de espermatozoides que se agregan a cada gota dependen del semen utilizado, pues si se trata de semen convencional la cantidad de semen pueden variar entre 5-10 μ l , mientras que si el semen es sexado lo recomendable es empezar a fertilizar con una cantidad de 10 μ l ya que este semen en estas condiciones está muy diluido y no rinde en el proceso de la fertilización, se necesita mayor volumen(41). Son alrededor de 100.000 espermatozoides por cada ovocito.

Los ovocitos y los espermatozoides se deben mantener en un medio suplementado con fuentes energéticas (piruvato, lactato) y albúmina sérica. En la especie bovina, la capacitación espermática se ve favorecida por la incorporación de heparina al medio. No obstante, para lograr unos resultados óptimos es necesario ajustar la concentración de heparina y el número de espermatozoides para cada eyaculado concreto(40)

Aquellos embriones de 4 o más células resultantes de la FIV son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo embrionario donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta llegar a mórulas y blastocistos. Al llegar a estos estadios, los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras(en fresco) o congelados para su posterior uso. Durante esta etapa destacan la presencia en el medio de cultivo de diversas fuentes de energía como la glucosa y aminoácidos esenciales y no esenciales(40)

20.1 Cultivo de los embriones

Los medios utilizados para el cultivo de los embriones bovinos han sido clasificados en tres categorías(16,18,20,26,42,43):

Indefinidos: cuando se utiliza suero y cocultivo con células somáticas.

Semidefinidos: cuando se omite el cocultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica.



Definidos: cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona.

Existen 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 aun no son del todo satisfactorias(16,18,20,26,42,43).

Los sistemas de cultivo in vitro pueden clasificarse de la siguiente manera:

Co-cultivo: Involucra la asociación de los cigotos con otro tipo de células en el medio de cultivo. Para esto se utilizan células somáticas tales como las células de la granulosa u oviductales, que al desarrollar puede producir y liberar factores de crecimiento, hormonas, etc, que podría favorecer el desarrollo embrionario temprano. Se ha propuesto que las células somáticas podrían remover sustancias tóxicas o disminuir la tensión de oxígeno en el microambiente que rodea al embrión. Actualmente los cultivos se realizan en estufas que controlan el CO₂ y el O₂ para lograr un ambiente con presiones parciales entre 40-60 mmHg, las cuales son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas(18,26).

Definidos-no definidos: Refiere a aquellos donde se tiene o no conocimiento de todos los componentes con los cuales son preparados. 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(16).

Secuenciales o no secuenciales: Los no secuenciales son aquellos sobre los cuales no se efectúa 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 podría afectar su viabilidad(16).

20.2 Parametros biofisicos y elementos inorgánicos para los medios de cultivo

Varios autores coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario son los siguientes(26,42):

- Osmolaridad. Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/Kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario(26,42).
- pH. La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados in vitro desarrollan un pH neutro o ligeramente alcalino, encontrando los mejores resultados entre 7,2 y 7,6.
- CO₂ y O₂. La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO₂ en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas(26,42).
- El fluido oviductal bovino y ovino se caracteriza por bajos niveles de Na y altos niveles de K, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos(26,42).
- 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. Las fuentes de agua utilizadas han sido el agua de lluvia, la obtenida por sucesivas destilaciones o actualmente la producida por sistemas de purificación que utilizan el principio de ósmosis reversa. En estos últimos equipos, el grado de pureza del agua



puede ser controlado mediante la determinación de su resistencia al paso de la corriente eléctrica (cuanto mayor sea ésta, mayor será su pureza). La mayor resistencia ofrecida es 18,3 megaohms-cm a 25°C”(26,42).

En todos los casos no se recomienda almacenar por largos periodos 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(26,42).

Compuestos orgánicos.

Actualmente, existe una gran cantidad de información, no siempre coincidente, referida al efecto de ciertas hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares, sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, dos componentes son constantes en las formulaciones finales de los medios de cultivo utilizados corrientemente en la producción in vitro de embriones(22). Estos son:

Fuente de energía. “Las fuentes de energía más utilizadas en los medios de cultivo de embriones son, en general, el lactato, el piruvato y la glucosa. Se ha demostrado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo(22).

Con respecto a los lípidos, poco se sabe acerca de la importancia que tendrían en la producción de energía durante el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, en los últimos años 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(22).



Aminoácidos.- Varios autores indicaron que 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 intracelular y para la síntesis de proteínas, siendo incorporados por transportadores de membrana específicos regulados en función del estadio de desarrollo o en respuesta a señales externas(43).

La albúmina 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. Junto con la inmunoglobulina G, son las proteínas más abundantes del fluido oviductal, y su pureza puede variar entre lotes(43).

Algunos de los efectos benéficos que justifican la utilización del suero y la albúmina son(16):

- Proteger a los embriones en cultivo de sustancias tóxicas (ej. metales pesados).
- Aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas.
- Reducir la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental (placas de cultivo, pipetas, tubos, etc.).

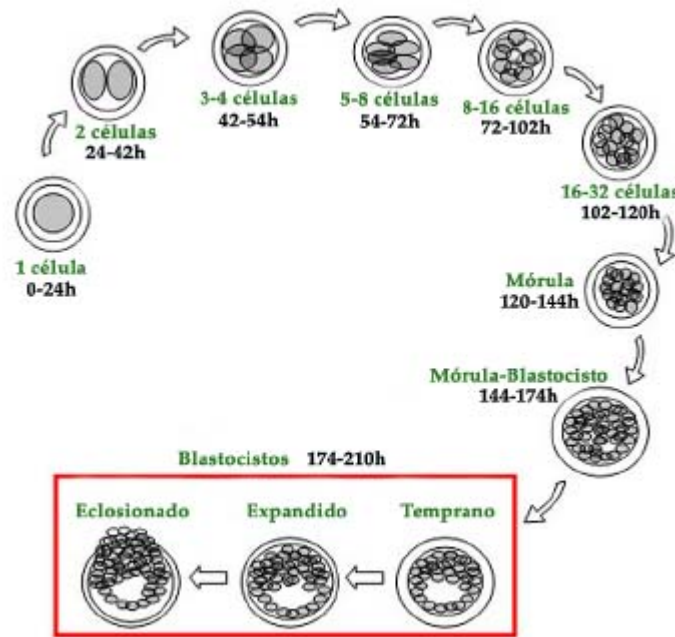


Imagen 35. Representación gráfica de la evolución del embrión.

(Ultimas noticias ciencia)

21. Siembra del embrión

Una vez que el embrión alcanza los 7 días de edad, y su estado es de mórula o blastocisto, está en condiciones de ser transferido a una hembra receptora para llevar a cabo la preñez y parto. El embrión es cargado en una pajuela idéntica a las usadas para semen, o sea de 0.5 ml. El embrión va colocado en el centro de la pajuela, que debe tener dos cámaras de aire (ver imágenes n°36 y n°37). La pajuela con el embrión se carga en una pistola de inseminación(31).

Por otro lado la técnica de siembra del embrión en la hembra recipiente es similar a la de la inseminación pero la pipeta en la que va la pajuela que contiene el embrión debe ser introducida en el cuerno uterino ipsilateral al ovario que tiene el cuerpo lúteo. De modo que el primer paso es verificar en qué ovario está ubicado el cuerpo lúteo y sembrar el embrión en el cuerno uterino del mismo lado(29).



La pipeta debe ser introducida en el cuerno uterino con sumo cuidado para no hacer daño a la mucosa uterina(45).

El diagnóstico de preñez se puede hacer a los 28 días de gestación. Conviene confirmar la preñez y la evolución del feto al menos un par de veces durante la preñez(7).

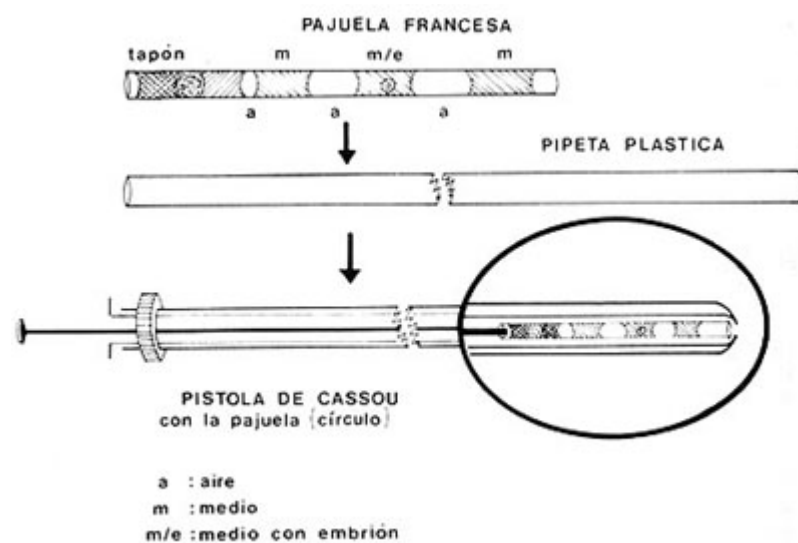


Imagen 36. Representación gráfica de una pajuela con el embrión, la pipeta plástica y la pistola de Cassou armada lista para implantar el embrión. (Del campo. M)

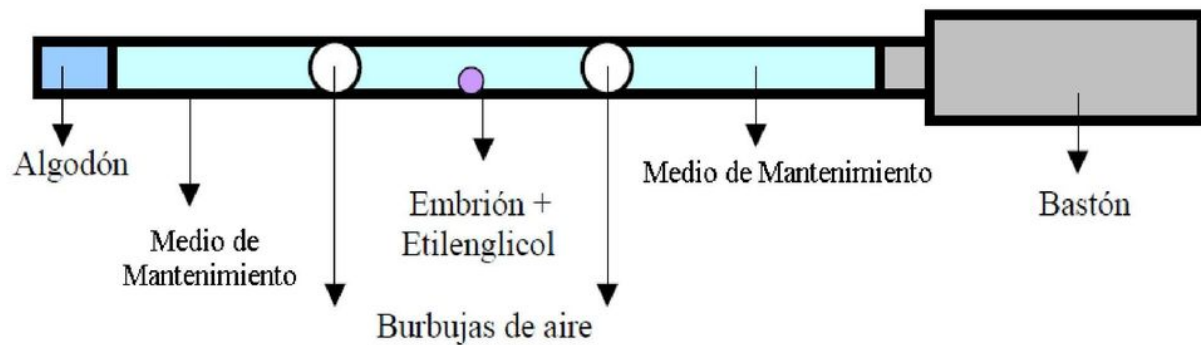


Figura 1. Representación esquemática de una pajuela con un embrión congelado (Görlach 1997).

Imagen 37. Representación gráfica de una pajuela con un embrión congelado. (Betancourth F, Caceres G)

22. De la hembra receptora

La hembra bovina que va a recibir el embrión y que va a llevar adelante la preñez hasta el parto debe reunir una serie de cualidades, de las cuales la más importante es que esté en el mismo día del ciclo sexual que la edad del embrión, es decir que como los embriones son de 7 días de edad, la hembra receptora debe estar en el día 7 de su ciclo sexual, con un cuerpo lúteo bien desarrollado. Debe tener buen desarrollo físico, y es conveniente que sea de fertilidad conocida, es decir que haya tenido al menos una cría. También estar bien alimentada, y es conveniente que esté en balance energético positivo, es decir que esté ganando peso(20).

Otro punto a tener en cuenta es que la hembra debe estar un buen estado sanitario, habiendo recibido un programa de inmunización adecuado a la zona, que prevenga enfermedades infecciosas que causen aborto o



pérdidas, y un control de enfermedades parasitarias que afecten la fertilidad, como la neosporosis, la toxoplasmosis o la trichomoniasis(20).

La hembra recibe el embrión y, si queda preñada, debe recibir los cuidados adecuados para una hembra gestante(56).

23. El uso de semen sexado en FIV

En experiencias realizadas en Japón y en USA se ha podido comprobar que se puede usar semen sexado para fertilizar ovocitos, pero puede haber diferencias en el desarrollo posterior de los embriones hasta el estado de blastocisto, pero tiene significativa importancia el aspecto individual de cada toro(26).

Las tasas de fertilización con semen sexado son similares a las tasas de fertilización con semen no sexado, pero se advirtieron diferencias en cuanto al desarrollo posterior de embriones que habían sido fertilizados con semen de algunos toros, o sea que el factor individual tiene importancia pero no el hecho de haber sido sometido a la citometría de flujo para separar espermatozoides de uno y otro sexo.(26, 33, 34, 36, 37, 50, 52,54).

El uso de semen sexado en FIV es de alto interés en ganado lechero, en el que los propietarios prefieren tener terneras y no terneros. O en determinadas producciones carniceras que por el contrario deseen obtener machos para producir novillos y no hembras (33,52).

24. Resultados

El porcentaje de clivaje, es decir de ovocitos fertilizados que se duplica y se transforma en un embrión de 2 células, va del 58 al 76%. El porcentaje de embriones que culminan la incubación y al cabo de 7 días se han transformado en blastocistos, va del 26 al 54%. Existen grandes y significativas diferencias individuales entre hembras, por lo



que este dato es un dato más a tener en cuenta al seleccionar hembras por superioridad genética(1).

Las razas índicas rinden más ovocitos por cada procedimiento de OPU : en promedio de las hembras Nelore se obtienen 23/24 ovocitos totales de los cuales 14/15 son viables. En cambio de razas británicas o cruza europeas se obtienen 12/13 ovocitos, de los cuales 6/7 son viables. Por otro lado en cuanto a obtención de blastocistos luego de 7 días de incubación las diferencias no son tan grandes; de las razas índicas se obtienen 48/49 % de blastocistos, y en las británicas o cruza europeas se obtienen 40/42% de blastocistos sobre ovocitos fertilizados y cultivados.(1)

En cuanto a preñeces obtenidas con estos blastocistos sembrados en hembras receptoras, se obtienen en promedio en todo el mundo un 37% de preñeces al día 30 y un 33% de preñeces al día 60. El procedimiento OPU/FIV permite obtener 8 embriones y 3 preñeces en cada ocasión, y se puede aplicar hasta 2 veces por semana en la misma vaca sin consecuencias indeseables, durante semanas(20).

De las vacas de alta producción de ovocitos viables se pueden obtener hasta 55/60 ovocitos en cada procedimiento, de las vacas de mediana producción 30/33 ovocitos, y de las vacas de baja producción se obtienen 10 ovocitos en promedio(20).

Las hembras bubalinas pueden ser sometidas al procedimiento OPU/FIV, pero su rendimiento es bajo: rinden 2, 3 ovocitos por colección, de los cuales el 65 % son viables, y se obtienen 0.25 embriones de búfalo transferibles por cada procedimiento(1).

25. Conclusión

Hace 40 años que se aplica la FIV en bovinos, y los avances han ido a la par de los avances en FIV en humanos. Los primeros años se la aplicaba en hembras con problemas reproductivos o que simplemente no respondían



a los tratamientos de superovulación tradicionales y no producían embriones. Las biotecnologías reproductivas en bovinos han demostrado significativos avances en los últimos años, y la producción in vitro de embriones ha crecido significativamente en USA, Sudamérica y en Europa. De todas las biotecnologías, la que más avances muestra semana a semana es la Fertilización in vitro, a pesar de tener todavía algunos obstáculos a vencer, como el uso de semen sexado, que sigue dando menores resultados de preñez que el semen sin sexar, o la congelación de ovocitos, o la maduración in vitro de oocitos inmaduros, que no tiene los mismos resultados que la maduración in vivo, o la menor resistencia a la criopreservación que tienen los embriones producidos in vitro frente a la mayor criotolerancia que tienen los embriones producidos in vivo.

Por lo tanto se puede decir que los embriones producidos en el laboratorio se implantan menos y congelan peor que los embriones producidos in vivo. También tienen mayores pérdidas embrionarias y fetales que los otros. Esos son los desafíos de los próximos años.

En nuestro país todavía la FIV no está difundida como en Brasil, a pesar de ser de fácil realización y tener muy buenos resultados con animales problemáticos o que no responden a los tratamientos de superovulación y colección de embriones tradicionales. La Fertilización in vitro no va a desaparecer sino todo lo contrario; a los productores les interesa mucho poder producir embriones con sexo conocido, sobre todo a los productores lecheros. También se puede hacer selección genómica en el estado de blastocisto. La selección genómica de animales jóvenes, la producción de embriones sexados y las técnicas de criopreservación aseguran el futuro de la FIV.

El propósito de esta tesina es difundir las ventajas de esta técnica en la esperanza de verla implementada a lo largo y ancho del país, y especialmente en la provincia de San Luis.

Bibliografía



- 1) Alaves G Comparison between in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows Research, Society and Development, v. 10, n. 7, e38810716712, 2021 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16712>
- 2) Alvarado JM Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vacas criollas y ovarios de matadero Tesis previa a la obtención del título de Magister en Reproducción animal UNIVERSIDAD DE CUENCA Facultad de Ciencias Agropecuarias MAESTRÍA EN REPRODUCCION ANIMAL, 2017
- 3) Arieta R, De Jesús R, Fernández F, Antonio J, Menchaca P, Jackeline Métodos de Extracción de Semen Bovino Rev. Electrón. vet. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> 2014 Volumen 15 N° 05 - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050514.html> Revista electrónica de Veterinaria - ISSN 1695-7504
- 4) Arthur GH Noakes DF Pearson H Parkinson TJ Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. Saunders. Elsevier limited 2001
- 5) Báez F Chávez C Hernández H Villamediana P Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus* Rev. cient. (Maracaibo) v.20 n.3 Maracaibo jun. 2010
- 6) Baldassarre H Neto PNJ Requena LA Schilbach Pizutto C Laparoscopic ovum pick-up (LOPU) from animal production to conservation. August 2018.Spermova 8 (1) 61-67
- 7) Baldassarre H Laparoscopic ovum pick up followed by in vitro embryo production and transfer in assisted breeding programs for ruminants. January 2021. Animals 11 (1) 216 DOI 10.3390/ani11010216.
- 8) Baldassarre H, Bordignon V. Laparoscopic ovum pick up for in vitro embryo production from dairy bovine and buffalo calves. Anim Reprod. 2018 Aug 16;15(3):191-196. doi: 10.21451/ 1984- 3143- AR2018-0057.PMID: 34178141
- 9) Barbosa A Fernandes L Dias R Lopes G Anghinoni G Almeida A Piores L In vitro performance of Zebu (*Bos indicus*) and Taurus (*Bos taurus*) donor cow embryos <https://doi.org/10.1590/S1519-994021200142020>



10) Benavides Torres, R. D. (2008). Evaluación de tres protocolos de capacitación espermática bovina in vitro a través de la penetración oocitaria. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/ 143

11) Brackett BG. A review of bovine fertilization in vitro. Theriogenology 1983

12) Bryant C Intracellular lipids in Bos indicus and Bos taurus oocytes etd-04122007-112125

13) Bustamante G Alayo E Alvarado M Mesia I Comparativo de la capacidad del desarrollo embrionario de Bos indicus y Bos taurus en embriones producidos in vitro DOI:[10.46908/rict.v3i2.123](https://doi.org/10.46908/rict.v3i2.123)

14) Camara Pirez M Steele H Reese S Kolle S. Bovine sperm-oviduct interactions are characterized by specific sperm behaviour, ultrastructure and tubal reactions which are impacted by sex sorting. Scientific Reports 2020 Oct 5;10(1):16522. doi: 10.1038/s41598-020-73592-1

15) Cornelisse S Zagers M Kostova E Fleischer K Wely M Mastenbroek M Preimplantation genetic testing for aneuploidies (abnormal number of chromosomes) in in vitro fertilization. Cochrane Database Syst Rev 2020 Sep 2020 (9) CD 005291 pub 3.

16) Crespo Calva JL Guamán Gutiérrez EG Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion. Escuela Agrícola Panamericana, Honduras, noviembre 2015.

17) DeJarette M Nebel R Anatomía y Fisiología de la Reproducción Bovina
https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/97-fisiologia.pdf

18) Fernández A Díaz T Muñoz G. Producción in vitro de Embriones Bovinos. Rev.Fac.Cs.Vet. UCV 48 (1) : 51-60 2007

19) Ferré LB Kjelland ME Strobech LB Hyttel P Mermillod P Ross PJ

Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods Animal Vol 14 Issue 5, 2020, pages 991-1004.



20) Filipiak Y Larocca C. Manual Fertilización In Vitro en Bovinos. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Area de Biotecnología de la Reproducción. Montevideo, República Oriental del Uruguay. 2010.

21) Garcia Herradón P Quintela Arias LA Becerra JJ Ruibal S: Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos. Octubre 2007. Conferencia XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA) en Cuzco Perú Volume 1022-1301

22) Gonella Diaza AM Atuesta Bustos JE Bernal Ulloa SM Chacon Jaramillo L. Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro Revista de Investigacion Agraria y Ambiental. Vol 4 num 1 enero-junio 2013.

23) Gonzalez K Anatomía reproductiva de la hembra bovina <https://zoovetespasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/anatomia-reproductiva-de-la-vaca>

24) Gonzales K anatomia del aparato reproductor del toro <https://zoovetespasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/anatomia-del-aparato-reproductor-masculino-bovino/>

25) Gonzalez K El ciclo estral de la vaca <https://zoovetespasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/el-ciclo-estral-de-la-vaca/>

26) Greve T Madison V. In vitro fertilization in cattle: a review. Reproduction, Nutrition, Development. EDP Sciences, 1991, 31 (2) pp 147-157.

27) Guimaraes ASB Rocha LF de Jesús RDL Vasconcelos GL Anghinoni G Santana ALA Barbosa LP. In vitro performance of Zebu (*Bos indicus*) and Taurus (*Bos taurus*) donor cow embryos. Animal Reproduction. Revista brasileira de saude e producao animal 21 (2020) <https://doi.org/10.1590/S1519-994021200142020>

28) Inaba Y Abe R Geshi M Matoba S Nagai T Somfai T Sex sorting of spermatozoa affects developmental competence of in vitro fertilized oocytes in a bull-dependent manner J Reprod Development oct 2016 62 (5), 451-456 2016 Oct 18;62(5):451-456. doi: 10.1262/jrd.2016-032. Epub 2016 Jun 10.



- 29) Kamath MS Mascarenhas M Kirubakaran R Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection Cochrane Database Syst Rev. 2020 Aug 21;8(8):CD003416. doi: 10.1002/14651858.CD003416.pub5.PMID: 32827168
- 30) Landry DA Bellefleur AM, Labrecque R, Grand FX, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments Theriogenology. 2016 Sep 15;86(5):1240-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.064. Epub 2016 Apr 24.PMID: 27215669
- 31) Marquant-Le Guienne B Humblot P Tests de fertilité chez l'animal domestique par fécondation in vitro Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences, 1992, 41 (3-4), pp.361-370. fahal-00888852f
- 32) Maicas C Fertility of fresh and frozen sex-sorted semen in dairy cows and heifers in seasonal-calving pasture-based herds Journal of Dairy Science 2019 Nov 2019 ;Vol 102(11):pages 10530-10542. doi: 10.3168/jds.2019-16740. Epub 2019 Aug 22.
- 33) Martínez. Y. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA OVOCITARIA EN BOVINA PREVIA A FECUNDACIÓN IN VITRO UNIVERSIDAD DE OVIEDO MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
- 34) Mendez J Graves W estrategias de detección de celo del ganado bovino Bulletin 1212-SP university of georgia extension
- 35) Mertens EM Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in Bos indicus, Bos indicus-taurus, and Bos taurus cattle Der Einfluss der in vitro Kultur boviner Embryonen auf die Struktur der extraembryonalen Matrix (Zona pellucida)
- 36) Morotti F Sanches BV Pontes HF Basso AC Siqueira ER Lisboa LA Seneda MM Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in Bos indicus, Bos indicus-taurus, and Bos taurus cattle Theriogenology 2014 Mar 15;81(5):696-701. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.12.002. Epub 2013 Dec 12.



37) Oses MV Teruel MT Cabodevila JA Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro* Revista Veterinaria vol 20 num 2 (2009)

38) Palma AG Olivier NS Neumuller CH Sinowatz F Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts 2008 Feb;37(1):67-73. doi: 10.1111/j.1439-0264.2007.00795.x.

39) Parrish J Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen 1986 Apr;25(4):591-600. doi: 10.1016/0093-691x(86)90143-3.

40) Pelaez VA "PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS" Monografía previa a la obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2019.

41) Ptaszynska M, Molina J J "Compendio de reproducción animal" Sinervia Uruguay/Paraguay Diciembre, 2007

42) Ramirez Orozco JA "Formación en producción in vitro de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia Medellín > Colombia octubre 2020

43) Rodriguez P Jimenez C CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO Rev. Med. Vet. Zoot. vol.58 no.2 Bogotá May/Aug. 2011 Print version ISSN 0120-2952

44) Roman A Jesus R Figueroa F Antonio J Peña M Jackelline Métodos de Extracción de Semen Bovino . <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> 2014 Volumen 15 N° 05 - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050514.htm> ISSN 1695-7504

45) Salgado. E Lopera. R Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos Rev. investig. vet. Perú vol.31 no.3 Lima jul-sep 2020 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.17138>

46) Schneider T Epigenetische Effekte der in vitro-Maturation von Eizellen auf DNA-Methylierungsprofile entwicklungsrelevanter Gene im Modellorganismus

47) Senger PL Pathways to pregnancy and parturition. 2nd edition. Current Conceptions Inc. Pullman WA 2003



- 48) Silvestri G Canedo Ribeiro C Serrano Alba M Labrecque R Blondin P Larmer SG Marras GTutt DAR Handyside AH Farré M Sinclair KD Griffin DK Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Live Birth Rates with In Vitro produced bovine embryos: a blind retrospective study. *Cells*. 2021 Sep 2;10(9):2284. doi: 10.3390/cells10092284.PMID: 34571932
- 49) Sirard MA 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction* 2018 Jul;156(1):R1-R7. doi: 10.1530/REP-18-0008. Epub 2018 Apr 10.
- 50) Underwood SL Embryo production after in vitro fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm 2010 Jan;73(1):97-102. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.08.005. Epub 2009 Oct 22.
- 51) Valente Sanches B Fonseca Zangirolamo A Marcondes Seneda M Intensive use of IVF by large-scale dairy programs September 2019 *Animal Reproduction* 16(3): 394-401 DOI: 10.21451/ 1984-3143-AR2019-0058
- 52) Viotti G PROCESAMIENTO DE SEMEN BOVINO PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias Orientación: Producción Animal Modalidad: Revisión Bibliográfica FV-29377 MONTEVIDEO URUGUAY 2011
- 53) Wei Sun Correlation between in vitro fertilization and artificial insemination in Holstein bulls. *Anim. Bioscience* 2021 Dec;34(12):1879-1885. doi: 10.5713/ab.20.0665. Epub 2021 Feb 16.
- 54) Wheeler M Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle 2006 Jan 7;65(1):219-27. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.032. Epub 2005 Nov 2.
- 55) Wohlrres S Munk M. A.P Olivera Moreira J 257 DIFFERENCES BETWEEN BOS TAURUS AND BOS INDICUS EMBRYOS: TRANSCRIPTS AMOUNTS DOI:10.1071/RDv22n1Ab257
- 56) Wu J Guo Z Nedambale TL Zhang J Moreno JF Dinnyes A Tian XC Yang X Du F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos



fertilized in vitro with sex-sorted sperm J. Dairy Science 2006
Jul;89(7):2510-8. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72326-8

