

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIFERENCIAS EN LA EFICIENCIA DE PRODUCCIÓN DE
EMBRIONES *IN VITRO* ENTRE *BOS TAURUS* Y *BOS INDICUS*,
BAJO LAS MISMAS CONDICIONES DE CLIMA, AMBIENTE Y
MANEJO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

PRESENTA

EDUARDO OLIVARES CASTELLANOS

Asesores:

MVZ M.C. PhD David Alejandro Contreras Caro del Castillo

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis al pequeño niño de hace 15 años que sabía lo que le apasionaba y que posteriormente decidió por estudiar y entregar su vida al bienestar animal y humano. Gracias a sus ilusiones y sueños esto lo pude lograr sin dudar que lo alcanzaría, quizá sin saber cómo hacerlo, pero sin falta de ganas, dedicación y amor. Que aún falta mucho más por avanzar y superarme, pero voy caminando.

También la dedico a todas las personas que influyeron en mi para poder hacerlo desde mis abuelos a los que siempre les gustaron los animales y me inculcaron ese amor e interés por ellos, a mis padres que me dieron las oportunidades para llegar a este punto, así como me enseñaron a trabajar por lo que quiero, a mis hermanos, amigos y las personas que pasaron a lo largo de mi vida a las que les aprendí cosas buenas y malas, a mis profesores y jefes que me han enseñado tanto y estoy tan agradecido por ello, a mi novia Erandi N. Villegas G. que me ha dado tanto estos años y espero sean muchos más para poder seguir creciendo a su lado. Así como a la magia del saber y el conocimiento que me mueve para poder avanzar y poder ser mejor profesional ya que mejor persona he podido crecer gracias a la ayuda de cada uno de ustedes.

II.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a todos los que me han apoyado en todos los momentos de mis estudios, por haberme dado fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme la oportunidad de llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional. Le doy gracias a mis padres por ser unos pilares importantes, por demostrarme su apoyo y cariño incondicional en cada momento de mi vida. Gracias a ellos aprendí a querer superarme cada vez más, también por darme la oportunidad de tener una excelente educación y ser el mejor ejemplo a seguir. A mis hermanos, por ser parte importante de mi vida y el valor de lo que es una familia. Le agradezco la confianza, tiempo, apoyo y paciencia al MVZ M.C. PhD David Alejandro Contreras Caro del Castillo, quien ha sido mi profesor y asesor de tesis quien me ha guiado en este complicado proceso. Así como por haberme dado la oportunidad de formar parte de sus investigaciones junto al MVZ PhD Carlos Salvador Galina Hidalgo y colaboradores. Al comité de grado: MVZ M.C. Pedro Ochoa Galván, MVZ Esp. José Ignacio Sánchez Gómez, MVZ M.C. Eduardo Posadas Manzano, MVZ M.C. PhD David Alejandro Contreras Caro del Castillo y MVZ MVSc PhD Ivette Rubio Gutiérrez por apoyarme incondicionalmente durante mi formación profesional. A mis compañeros y amigos por haber hecho el papel de una verdadera familia en todo momento. Gracias por su apoyo, comprensión y, sobre todo, su amistad.

Agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM por la excelente formación recibida, a los centros de enseñanza de la facultad que me brindaron muchos conocimientos y anécdotas, a la Unión Ganadera Regional de

Tamaulipas en especial al Centro de Desarrollo de Capacidad Productiva y Mejoramiento Genético Bovino que gracias al aceptarme para poder realizar las prácticas y obtener la información para el desarrollo de mi tesis. Al director el MVZ Esp Repro. Francisco Javier Trejo Meza, así como su equipo que me acogió dentro de las instalaciones para compartir su conocimiento y amistad.

Por último, agradecimientos a los ganaderos, dueños de animales y mascotas que me han permitido ejercer como médico veterinario este poco tiempo que lo he realizado, ya que me han dejado desarrollarme a través de triunfos y fracasos en la toma de decisiones y espero poder obtener grandes triunfos en mi futuro.

III.

CONTENIDO

Contenido

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
MATERIAL Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	53
FIGURAS	59
CUADROS	61

RESUMEN

En la actualidad se ha extendido el uso de técnicas de reproducción asistida para ganado bovino. Tal es el caso de la técnica FIV, que ha tenido gran crecimiento a lo largo de los últimos años. En la actualidad se transfieren más embriones FIV que por otras técnicas como la convencional. El termino Fecundación In Vitro (FIV), implica que esta se realiza en un laboratorio, involucrando el control de los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femeninos y masculinos en un ambiente artificial con el fin de producir embriones (Filipiak, Y. y Larocca, C. 2010). A través de los años se han tratado de estandarizar los procesos por lo que se han diseminado a lo largo del mundo. En este trabajo se evaluó un laboratorio donde se lleva a cabo el proceso FIV en el estado de Tamaulipas en México.

Se realizaron 967 aspiraciones en el lapso aproximado de un año, donde 546 donadoras son las que sufrieron la OPU. Donde en promedio cada donadora es sometida a 1.7 aspiraciones en ese lapso. Con estos datos se evaluó cada etapa de la Fertilización In Vitro, la viabilidad de la MIV, a través de la FIV, en la etapa de CIV y la clasificación para la criopreservación. Donde en promedio por OPU realizada el 51.58% de los COCs obtenidos son viables para seguir avanzando a la siguiente etapa. Normalmente en la etapa de MIV y FIV no disminuye en ovocitos viables. Una vez en la etapa de CIV se ve afectado la calidad y viabilidad de los ovocitos que están desarrollándose. Existe una disminución considerable en el día 3 de la CIV, por lo que el reto es encontrar algún medio nuevo que favorezca un mejor desarrollo de los embriones.

En la actualidad la FIV en México se ocupa para animales de alto valor genético y se propaga rápidamente por lo que en su mayoría el destino final de los embriones producidos por la técnica FIV se vitrifica siendo resguardados para su uso posterior.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las técnicas de laboratorio para la obtención de embriones de ganado bovino cada vez son más utilizadas, lo que se busca es incrementar la producción de embriones bovinos de animales superiores genéticamente, esto se consigue a través de diferentes métodos, ya que naturalmente la vaca puede tener solo 1 cría al año, además de que la mayoría de los folículos no fertilizados se atresian, independientemente de la fase del ciclo estral que se encuentra (Rodgers y col., 1998); con esto se maximiza la diseminación de la genética con la obtención de folículos viables para ser fertilizados. Se menciona que la hembra bovina puede tener un aproximado de 75 mil oocitos en cada ovario (Gonella Diaza AM et al, 2013). Esto dio hincapié a establecer y estandarizar técnicas para incrementar el número de crías de vacas sobresalientes genéticamente.

Las técnicas para la producción de embriones se han desarrollado desde hace muchos años, son dos diferentes tipos de producción: In vivo (MOET) e In vitro (FIV).

Cuando se empezaron a estandarizar las técnicas, entró la duda sobre lo que pasaba con las enfermedades reproductivas o transmisibles entre madre a cría, por lo que se han desarrollado diversos estudios que demuestran que las enfermedades reproductivas no se transmiten al menos por embriones producidos in vivo. Lastimosamente para los embriones producidos in vitro no es así, ya que la zona pelúcida difiere entre los embriones producidos in vivo, lo que significa que es más probable la diseminación de enfermedades, por lo que para la movilización internacional de embriones in vitro se deben revisar los protocolos

a fondo para evitar diseminaciones de enfermedades en hatos libres o países en los que no existen ciertas enfermedades.

Aun así, se han dividido las enfermedades según el posible riesgo que tenga para infectar los embriones. La categoría 1 son las enfermedades que no presentan riesgo siempre y cuando la recolección y transferencia se realice de manera adecuada. Las enfermedades de la categoría 1 son la Leucosis bovina enzoótica, Fiebre aftosa, Lengua azul, *Brucella abortus*, Rinotraqueitis infecciosa bovina y Encefalopatía espongiiforme bovina. Las categorías siguientes, no cuentan con tanta investigación como las del grupo 1, sin embargo, aun así, ninguna de las enfermedades se ha presentado como consecuencia de la transferencia de embriones in vivo (Mapletoft, R.J., 2013). Todo esto da hincapié a realizar cada vez más la movilización de embriones a animales en pie ya que es mucho más sencillo y económico que transportar animales vivos.

Se explicarán brevemente las técnicas, así como sus ventajas y desventajas.

MOET, producción de embriones in vivo, multiovulación y transferencia de embriones

Desarrollada a principios de los años 70's, la técnica está basada en la recolección del máximo de ovocitos fecundados obtenidos por medio de la superovulación de la vaca donadora. Esto se realiza por medio de hormonas exógenas, una vez los ovocitos fecundados tengan entre 6 a 7 días son recolectados para ser transferidos en fresco o criopreservados por curva lenta.

Las técnicas para la recolección y la transferencia de embriones se han visto modificadas, ya que en sus inicios se realizaban a través de técnicas quirúrgicas (Colazo and Mapletoft, 2013), en la actualidad es de manera transrectal lo que

lo hace más sencillo y fácil de replicar. Gracias a esto se han masificado este tipo de biotecnologías.

Existen diferencias y ventajas entre las dos técnicas las cuales se procederán a mencionar.

Ventajas e inconvenientes de la MOET vs la FIV

Entre las mayores desventajas de la MOET se encuentran que las hembras necesitan tener una edad mínima para el inicio de los tratamientos, puede presentarse una nula o decremento a la respuesta de las hembras (tras múltiples tratamientos) a la superovulación, la necesidad de fijar períodos de descanso cada dos tratamientos de superovulación.

Las mayores ventajas de la FIV se concentran a que se pueden obtener mayor número de crías a comparación de cualquier otra técnica durante el mismo lapso de tiempo y que no es necesario tener una hembra vacía o después de la pubertad (se pueden realizar en hembras jóvenes o preñadas durante los primeros 3 meses de gestación) (Galli et al., 2001).

Además de que no es imprescindible el uso de tratamientos hormonales en la FIV, aunque existe un gran porcentaje que lo realiza. Existen diferentes estudios que demuestran que la superestimulación ovárica afecta a la calidad de los embriones recogidos (Machaty et al., 2012).

A pesar de sus supuestas ventajas de la FIV sobre la MOET, el porcentaje es desfavorable para el porcentaje de preñez, los embriones vitrificados tienen alrededor del 43 % de tasa de preñez a comparación de un 50% de embriones congelados por curva lenta producidos por MOET (Colazo and Mapletoft, 2013).

	Recolecciones	Total, ovocitos recolectados	# ovocitos/ recolección	Embriones viables	Transferidos en fresco	Criopreservados
Total	31,803	365,634	11.5	6.5	58,458	146,987
%			100%	56%	28%	72 %

Cuadro 1. Número de embriones transferidos y congelados por medio convencional (in vivo) 2018 en Estados Unidos (AETE, 2019).

A lo largo de los años se han modificado las estadísticas sobre la producción de embriones, en 2011 en Europa se realizaron 23,480 lavados uterinos de los cuales se obtuvieron 192,418 embriones. Donde el 93% de estos embriones fueron recolectados a través de MOET (AETE, 2012).

En la actualidad (2018) los porcentajes se han invertido ya que ahora los embriones producidos in vitro representan al 62 % de todos los embriones producidos en Estados Unidos.

	In vivo			In vitro			Total		
	Fresco	Congelado	Total	Fresco	Congelado	Total	Fresco	Congelado	Total
Total	58,458	99,698	158,156	180,081	80,112	260,193	238,539	179,810	418,349
%	37 %	63%	38 %	69 %	31 %	62 %	57 %	43 %	100 %

Cuadro 2. Número de embriones producidos en Estados Unidos y la comparativa de su destino, 2018 (AETE, 2019).

Situación actual de la transferencia de embriones.

El incremento en la producción de descendencia con respecto a 1 ternero/vaca/año de la IA, sería de 20-25 terneros/vaca/año con MOET y 80-100 terneros/vaca/año con OPU/FIV (Wagtendonk-deLeeuw, 2005).

Entre las desventajas de la OPU/FIV se encuentran una mayor complejidad en la técnica que conlleva tener mayor experiencia por parte del manejador, así como la necesidad de equipo especializado con precios elevados. Lo que da como resultado costos más elevados que MOET por ternero (Martínez, 2007).

Se espera que la técnica FIV llegué a tener tanta influencia en la industria de la cría animal como la propia IA, ya sea ganado de leche o carne con los siguientes objetivos: selección genética, cruzamientos y mejora de la fertilidad en los rebaños (Martínez, 2007).

En la actualidad otra técnica que se está usando es la división embrionaria con o sin determinación del sexo, entre el equipo que se necesita es un micromanipulador que tenga la capacidad de cortar el embrión. El proceso se realiza con la intención de obtener 2 embriones a partir de uno. Los mejores resultados se obtienen cuando los embriones divididos son transferidos en fresco, llegando a obtener la misma cantidad de gestaciones que el mismo número de embriones de inicio (Martínez, 2007).

Está técnica no tiene un gran auge debido a que al realizar manipulación del embrión se ve afectada la zona pelúcida provocando que sea más sensible a la

contaminación frente a bacterias, virus o algún otro agente infeccioso creando así restricciones para su transporte o movilización. Esto sin contar la disminución de la fertilidad de los embriones por lo que no recomienda congelar (Martínez, 2007).

Actualidad de la FIV.

Referente a la Aspiración folicular en 2012, en Europa se realizaron 4,975 OPUs, donde se recuperaron 37,884 oocitos de los cuales se obtuvieron 7,978 embriones transferibles. Dando como resultado a 2.2 embriones transferibles por OPU (Colazo and Mapletoft, 2013).

En la actualidad estos valores ya se modificaron y aumentaron considerablemente.

	Total			
	Sin FSH	Con FSH	Total	Promedio carne
Total de OPUs	58,304	50,523	108,827	24,022
Total oocitos recuperados	916,558	916,558	1,862,982	530,564
Oocitos por OPU	15.7	18.7	17.1	22.1

Cuadro 3. Número de OPUs realizadas en laboratorios FIV en Estados Unidos, realizadas con preparación de FSH o sin ella, 2018 (AETE, 2019).

De estos datos solo tomaremos las realizadas en ganado de carne, ya que nuestra comparación se realiza con ganado cárnico y sus cruza.

Eficiencia FIV en ganado de carne	Número de COC´s	%
Oocitos recolectados por OPU	22.1	100 %
Oocitos fertilizados por OPU	20.3	91.9 %
Embriones viables por OPU	6.9	34 %
Embriones viables por oocitos recolectados		31 %
Embriones criopreservados	4.7	21.3%

Cuadro 4. Eficiencia de embriones producidos por FIV en Estados Unidos, 2018 (AETE, 2019).

Se ha observado que la eficiencia de los embriones bovinos, cultivados in vitro presentan bajos porcentajes aún menores a la técnica MOET, los problemas se han identificado en las etapas después de la maduración y la fertilización de los ovocitos, pudiendo pensar a condiciones no óptimas de los cultivos o a la reducción del desarrollo de competencia de los ovocitos madurados (Fernández, Díaz and Muñoz, 2007).

Producción de embriones in vitro

Las técnicas de MIV y FIV en bovinos se empezaron a utilizar al final de la década de los setenta, registrándose el primer nacimiento a principios de los años

ochenta (Brackett et al., 1982). Incluso antes de esto hubo nacimientos de conejos a través de FIV.

El término Fecundación In Vitro (FIV), implica que esta se realiza en un laboratorio, involucrando el control de los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femeninos y masculinos en un ambiente artificial con el fin de producir embriones. (Filipiak, Y. y Larocca, C. 2010).

La FIV es un proceso que se lleva a cabo en diferentes etapas, las cuales son:

1. Recuperación y clasificación de los complejos cúmulus ovocitos (COC) obtenidos de los ovarios por medio de la técnica de ovario punción con aguja fina (OPU) de ejemplares vivos con alto valor genético.
2. Maduración de los COC
3. Fertilización
4. Cultivo y desarrollo de los cigotos.

Los embriones resultados de este proceso tienen diferentes destinos, ya sea la transferencia en fresco o la congelación ya sea por Curva Lenta o la Vitrificación.

Aspiración de los ovocitos.

Como primer paso, la Ovario Punción con aguja fina (OPU) es una aspiración de ovocitos realizada por una bomba de vacío que se realiza directamente de los folículos, todo esto es guiado por ultrasonografía. Donde se obtienen los ovocitos que están recubiertos de células del cumulus oophorus (cúmulus), también denominados Complejos Cúmulus Ovocito (COC) recuperados de folículos de tamaño medio y grande (<5 mm) (Fair y col., 1995; Hyttel y col., 1997).

En los bovinos los oocitos dentro de los folículos tienen un proceso de crecimiento lento, que llega a tardar hasta 6 meses (Camargo et al., 2006). Durante su crecimiento ocurre la competencia meiótica donde acumulan enzimas, RNA y proteínas que intervienen en los procesos de maduración, fertilización y desarrollo embrionario que deberá de llevar el oocito para obtener un embrión viable. Por lo que son incapaces de realizar procesos de transcripción de DNA, lo que significa que es conveniente usar oocitos de un tamaño de 5 mm o mayor para obtener mejores tasas de MIV (Gonella Diaza AM et al, 2013). Dejando de lado el uso de folículos menores a 2 mm ya que no son competentes para reiniciar la meiosis y los mayores de 8 mm pueden presentar atresia. Aunque (Rodgers y col., 1998) menciona que el tamaño del folículo no es la mejor indicación de su estado de desarrollo, lo que supone una mayor limitante en la selección de folículos para su cultivo. Finalmente, el número de COCs que se logra recuperar depende de la habilidad del técnico y de la propia donadora. (Filipiak, Y. y Larocca, C. 2010). Sin embargo, refleja una evidente relación entre el tamaño de los oocitos con la calidad y su futuro éxito en los procesos in vitro (Sirard, 2011).

Los ovocitos aspirados junto al líquido folicular se recolectan en tubos estériles para después proceder al lavado y filtrado de los ovocitos, para posterior realizar la clasificación de los COCs se hace por medio de la morfología de las células del cúmulus oophorus y las características del ovoplasma (Hosoe y Shioya, 1997).

Clasificación de los COCs:		
Clasificación	Calidad	Características a evaluar.
A	BUENO	Completamente rodeado por más de 3 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo.
B	REGULAR	Rodeado parcialmente por células del cúmulus o con citoplasma irregular.
C	MALO	Desnudo.
D	DEGENERADO	Rodeado por fibrina (con aspecto de tela de araña).

Cuadro 5. Clasificación de COCs (Liebfried I. y First N. L., 1979; Sato E. y col., 1990)

Otros autores mencionan que incluso los ovocitos desnudos pueden llegar a tener un desarrollo normal, siendo considerados como “malos” en muchas clasificaciones. (Dominico y First, 1991).

El número de capas de la granulosa en los COCs está correlacionado al desarrollo de embriones producidos In Vitro, de acuerdo a (Palma y col., 1996) presentan hasta un 18% de desarrollo los embriones con más de 6 capas de células de la granulosa tras cumplir el día 7 de cultivo a comparación del 4% presentado en los ovocitos con 4 a 6 capas de células de la granulosa.

(Fernández, Díaz and Muñoz, 2007) menciona que se puede obtener alrededor del 76.9% de eficiencia al fertilizar COCs con 2 a 6 capas de células del cúmulus

y alrededor de un 39.4 % de división celular. Siendo muy importante así la buena clasificación de los ovocitos a trabajar.

Maduración de los ovocitos.

Bajo las condiciones *In vivo*, los oocitos reinician la meiosis luego del pico ovulatorio de LH (Gonçalves, et al., 2001) lo que da paso a la maduración del oocito, este proceso puede durar entre 18 a 22 horas y va desde la profase meiótica de la primera división hasta la metafase II (segunda división). Posterior a la maduración, la metafase II se mantiene hasta la fecundación (Gonella Diaza AM et al, 2013). Esto es lo que buscamos lograr *in vitro* en esta etapa.

Por lo que, una vez obtenidos los ovocitos, *In Vivo* sufre cambios bioquímicos y metabólicos donde las gonadotropinas participan activamente en el desarrollo y maduración de los ovocitos (Palma y col., 2018). Por lo que se ha generalizado el uso de gonadotropinas bovinas u otras especies en los medios de maduración. Donde los medios buscan estandarizarse para lograr la maduración de los COCs.

Por lo que son indispensables los medios de cultivo, la forma más común de clasificarlos es la siguiente:

Medios Indefinidos: Estos contienen suero fetal bovino (SFB) o co-cultivo con células somáticas.

El suero fetal bovino aunque proporciona excelentes nutrientes, inhibe las divisiones celulares tempranas, y acelera el desarrollo de estadios más avanzados (Wrenzycki et al., 2004) esto sin olvidar que puede contaminar el

medio de cultivo con factores embriotóxicos (Gonçalves, et al., 2001) y reduce la supervivencia embrionaria tras la criopreservación por un exceso de lípidos citoplasmáticos.

El co-cultivo con células somáticas ayudan a remover radicales libres del medio CIV, pero se incrementa la variabilidad de resultados a las técnicas in vitro (Gonella Diaza AM et al, 2013).

Medios semidefinidos: Se reemplaza el SFB o los co-cultivos por albúmina sérica bovina (BSA). Se realiza este cambio, creyendo que la albúmina brinda la nutrición al embrión durante su desarrollo post-compactación (Camargo et al., 2006). Obteniendo como resultado mejores tasas a la criopreservación que SFB, sin embargo no excluye de posibles contaminantes durante el proceso MIV.

Medios definidos: Son medios sin proteínas, se reemplazaron por macromoléculas tales como el polivinil alcohol y polivinilpirrolidona. Se eliminan así los efectos nocivos de los otros medios, pero las tasas de embriones transferibles son menores en comparación a los indefinidos o semidefinidos (Camargo et al., 2006).

En general, los medios se clasifican así, pero es cuestión del laboratorio escoger o modificar los medios para obtener los resultados esperados. Teniendo en cuenta que la osmolaridad, la suplementación proteica, así como la suplementación hormonal son igual de indispensables para el desarrollo de los ovocitos. La suplementación hormonal se basa en las hormonas gonadotropinas LH y FSH ya sea una o la combinación de ambas, presente en la mayoría de los protocolos

de maduración *in vitro*. Ya que la presencia del pico de LH tiene un efecto positivo en el desarrollo de embriones (Palma y col., 1997).

La adición de SFB (Suero Fetal Bovino) al medio de MIV ha sido sugerida como un requisito para alcanzar una óptima expansión del cumulus y la maduración del oocito.

Otros factores relacionados con el ambiente de cultivo celular deben ser considerados como fundamentales para el desarrollo embrionario. Para esto, es necesaria una incubadora que mantenga una atmósfera gaseosa y temperatura constantes. Generalmente la MIV de oocitos bovinos es realizada a 39°C por 22 a 24 horas en atmósfera de 5% de CO₂ (Gordon, 1994; Oyamada & Fukui, 2004; Bermejo-Alvarez et al., 2010).

Fecundación *in vitro*

Técnica también conocida como inseminación, es el procedimiento en el cual los ovocitos maduros son cultivados junto a espermatozoides capacitados para poder ser fecundados. Los espermatozoides para alcanzar su capacidad fecundante deben ser sometidos a una preparación *in vitro* y con esto desencadenar la reacción cromosómica (RA) (Palma y col., 2018). La preparación del esperma debe ser simple, rápida, de bajo costo, controlando la concentración y el volumen final de la suspensión espermática.

Se debe tener un ambiente apto para la capacitación espermática y la fecundación, para esto el medio más usado es el FERT®, que contiene heparina. El co-cultivo es realizado por un periodo de 18 a 22 horas, a 39 grados C, a una

atmósfera de 5% de CO₂ (Palma, 2001). De manera *In vitro*, la heparina es el glucosaminoglicano más utilizado para capacitar los espermatozoides bovinos.

La capacitación espermática (CE) es cuando los espermatozoides adquieren la capacidad para fecundar *in vivo* tras ser depositados en el tracto genital femenino y durante la migración espermática, en la presencia de calcio extracelular se logra la unión a la zona pelúcida del oocito para la reacción acrosómica (Gonella Diaza AM et al, 2013). Existe interacción con los “factores capacitantes”, que depende del ciclo estral y la regulación hormonal (Bedford 1970, Brackett y Server, 1970).

El espermatozoide debe atravesar la zona pelúcida, por acciones enzimáticas y mecánicas (reacción acrosómica). Posterior a eso el oocito se fusiona con el espermatozoide, ocurre al contacto entre el segmento ecuatorial del espermatozoide y la membrana plasmática del oocito. Dando como resultado la despolarización de la membrana plasmática, aumento de las oscilaciones intracelulares de calcio, exocitosis de los gránulos corticales, aumento del pH intracelular y la síntesis proteica. Tras atravesar el espermatozoide la membrana plasmática del oocito se lleva a cabo una despolarización de la membrana, este proceso se conoce como bloquea vitelínico (Gonçalves, et al., 2001) lo que impide la polispermia.

Cultivo in vitro

Una vez finalizada la etapa de fertilización, se debe proceder a lavar en medio de cultivo los ovocitos para retirar el cúmulus, terminado esto se ponen en gotas

de medio con aceite mineral y se introducen a la incubadora o estufa por 7 días (Filipiak, Y. y Larocca, C. 2010).

Los medios CIV deben cumplir con las mismas condiciones que el útero. Se han usado aminoácidos para favorecer las condiciones de los oocitos, esto se ha visto beneficiado por un mayor desarrollo embrionario, sin embargo aumenta la concentración de amonio por lo que se debería reemplazar el medio cada 3 días (Takahashi & First, 1992). Así mismo, se ha descubierto que la glucosa más allá de los posibles beneficios que pueda brindar, como lo es la energía, durante el desarrollo aumenta la producción de radicales libre intracelulares siendo perjudicial por lo que se ha optado por el piruvato y el lactato para la formulación de los medios CIV (Camargo et al., 2006).

Es necesario mantener buenas condiciones de oxígeno, ya que en la mayoría de los mamíferos los embriones se encuentran en el tracto reproductivo a una concentración entre 3.5 a 8%, por lo que es indispensable tenerla estandarizada para obtener buenos resultados. Se ha demostrado que una concentración menor de 5% existe un incremento en la división celular, así como una mejor tasa de producción de embriones, a comparación de una concentración superior que produce una mayor cantidad de radicales libres. (Camargo et al., 2006).

Las condiciones de la incubadora son a 38°C, con 5% CO₂, las cuales deben permanecer así durante toda la maduración. Una vez dentro de la incubadora se hará la revisión del desarrollo celular, el día 3, el 6 y el 7. Con la finalidad de evaluar y verificar que los oocitos tengan un desarrollo normal durante el periodo de desarrollo a blastocisto, recordando que en las fases iniciales la división es asíncrona por lo que no todos los blastómeros se dividen simultáneamente, por

lo que es común ver embriones con un número impar de células (Latham et al., 2002). Una vez terminado el período de tiempo obtendremos los embriones viables y los degenerados.

Transcurrido este proceso se debe evaluar los embriones de manera cuantitativa y cualitativa. La primera forma evalúa en relación al número de embriones que alcanzan diferentes estadios de desarrollo sobre el número de ovocitos cultivados para la maduración o que presentaron división el día 0 (1 día después de la fecundación) presentado en porcentaje. En este trabajo es lo que se evaluará. La segunda forma, se refiere a la calidad de los ovocitos utilizados junto a los espermatozoides, la técnica realizada, el material e incluso hasta el trabajo del operador (Palma y col., 1997).

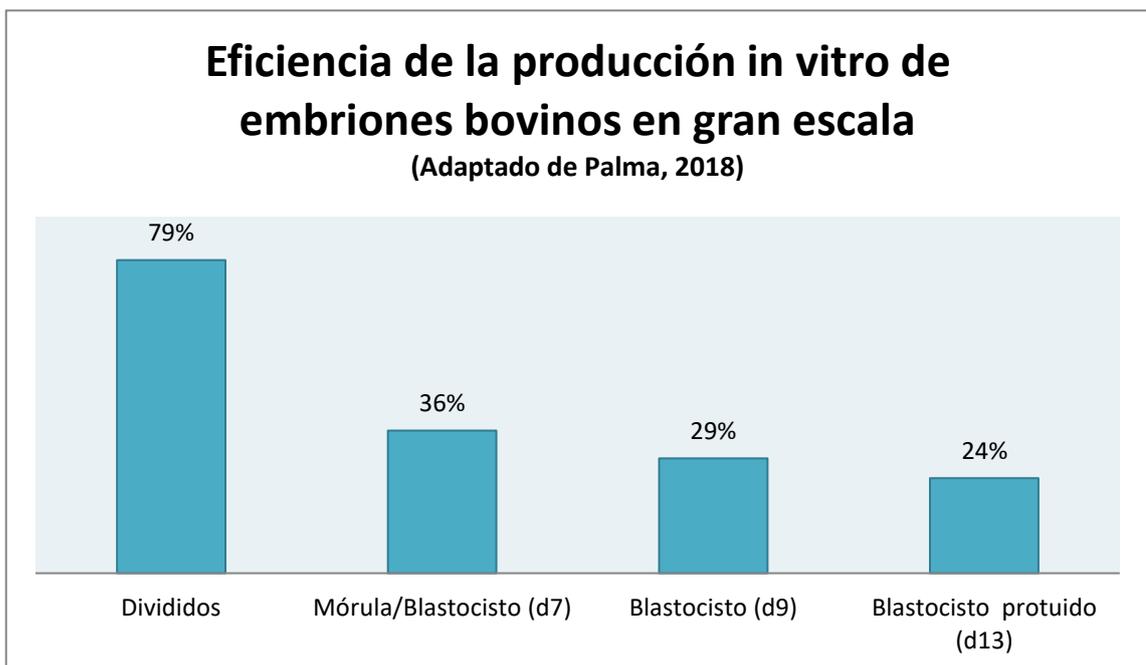


Figura 1. Eficiencia de la producción in vitro de embriones bovinos a gran escala (Adaptado de Palma, 2018).

La tasa de preñez no se puede predecir basado en la viabilidad de los embriones (Overstöm, 1996). Esto depende de infinidad de factores que incluyen desde el momento que se manipulan los embriones hasta después de realizar la transferencia. Por ejemplo, la técnica de congelamiento, medios de conservación, técnicas de descongelamiento o incluso la técnica de transferencia, sin mencionar otros.

Congelamiento

Los embriones viables se recolectan y se preparan para su uso en fresco o para su congelación. Los métodos utilizados son el de Vitrificación y Curva lenta.

Se ha descrito mayor viabilidad en embriones vitrificados al descongelarlos comparados con los embriones congelados y descongelados por curva lenta (Gil Magaña, et al. 2011) & (Nedambale *et al.* 2004).

Donde la tasa de eclosión a las 72 horas post calentamiento de los embriones vitrificados fue significativamente más alta que la de los congelados por curva lenta con una tasa de eclosión de 60% y 31% respectivamente (Nedambale *et al.* 2004).

Transferencia de embriones

Tras el proceso de transferencia de los embriones, su probable pre implantación depende del medio endocrino de la receptora, ya que las señales endocrinas influyen en la competencia del embrión. Tal como lo hace el Factor de

crecimiento similar a la insulina (IGF1) que puede incrementar la proporción de embriones no implantados que se convertirán en blastocistos (Moreira et al., 2002; Sirisathien et al., 2003). Sin olvidar que ayuda a mejorar la resistencia de los embriones al choque térmico y al estrés oxidativo entre los días 4 al 6 (Jousan y Hansen, 2004, 2007).

La tasa de gestación post transferencia en *B. Indicus* es baja (37-41%) mientras que la tasa de *B. taurus* es mayor (60-72%) (Rao, Umamahesh, & Rao, 2010)

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la UGRT (Unión Ganadera Regional de Tamaulipas) que se ubica en la carretera Ciudad Victoria - Soto la Marina km. 13, Tamaulipas con coordenadas (23.723187, -99.005970). Dentro de ella se encuentra el Centro de Desarrollo de Capacidad Productiva y Mejoramiento Genético donde se llevó a cabo diferentes biotecnologías reproductivas en ganado del estado de Tamaulipas. Entre ellas está la recolección y congelación de semen para producción de pajillas, producción de embriones por medio de la FIV, inseminación, manejo reproductivo y asesoría.

Se hará una evaluación estadística retrospectiva sobre la eficiencia que presentan durante el proceso de la FIV. Por lo que se recolectaron datos del periodo marzo del 2018 a noviembre del 2019, en donde realizaron el proceso de aspiración folicular (ovario punción) para llevar a cabo Fertilización In Vitro (FIV) en ganado bovino *Bos taurus*, *Bos indicus*, y razas sintéticas (*Taurus-indicus*).

La FIV dentro de las instalaciones se efectúa en varias etapas, y así se realiza:

1) OPU. La ovario punción es el proceso mediante el cual se recupera y clasifican los complejos cúmulus ovocitos (COC) de los ovarios.

Al comenzar las donadoras son lavadas y se les aplica un bloqueo epidural, así como la aplicación de un tranquilizante. Posterior a esto se realiza la aspiración folicular con la ayuda de un ecógrafo con una sonda con un brazo que lleva un catéter y se guía por palpación rectal con ayuda del mandril marca WTA® con

agujas especiales y bomba de vacío, se aspiran folículos de tamaño mediano y grande (>5 mm).

Se obtiene el COC en un tubo cónico para centrífuga 50 ml con DPBS a 36 grados, se rotula y pasa al laboratorio.

2) MIV. Maduración in vitro de los COC. Este procedimiento lo hacen los técnicos que se encargan de recibir el aspirado folicular y realizan un lavado con medio Flush®. Después se realiza la clasificación del contenido celular en un microscopio estereoscópico con placas térmicas en el mismo medio.

Una vez que se han seleccionado los viables se transfieren a una gota de 100 microlitros con medio de MIV marca WTA® y se colocan en la incubadora.

La incubadora con las siguientes condiciones 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂ a 38. grados centígrados a una presión de 15 mmHg por un lapso de 22-26 horas promedio.

El protocolo de MIV comienza con el mismo número de ovocitos viables de la clasificación que se lleva a cabo después de la OPU. Se lleva a cabo el día 1 el cual es el mismo día que la OPU, en el día 2 se lleva a cabo la fertilización In Vitro. Iniciando el día 2, se hace una revisión y si las condiciones de la MIV fueron las correctas debería de quedar el mismo número de ovocitos viables que al comienzo de la MIV; si hubiera un cambio se reajustan los valores. Pero al ser muy pocos casos no se alteraron los porcentajes entre el final de la MIV y el final de la FIV por lo que no existe diferencia entre la viabilidad de MIV y FIV.

3) FIV. Fertilización in vitro de los ovocitos.

El semen se descongela en agua a temperatura de 36°C por 20 segundos.

Se centrifuga con medio Percol® 400 microlitros y medio Sperm® marca WTA®, después se retira el remanente y se deja la pastilla en el criotubo, se agrega más medio para repetir la centrifugación.

Se prepara el medio FIV 35 microlitros con aceite mineral 3500 microlitros, se deja 30 min minutos en la placa térmica antes de pasarlos al medio preparado los ovocitos se deben enjuagar en medio de FIV (3 gotas) evitando que lleven consigo medio MIV.

Posteriormente se fecundan los ovocitos en las gotas con el semen. Una vez listos entran a la incubadora de nuevo.

4) CIV. Cultivo in vitro donde se desarrollan los cigotos.

Se inicia lavando los ovocitos fertilizados en gotas de 70 microlitros de medio CIV retirando el exceso de cúmulus tras cada pase de gota a gota (hasta 4 ocasiones). Inmediatamente las células sin cúmulus se ponen en placas con 500 microlitros de medio CIV y 400 microlitros de aceite mineral por los siguientes 7 días. Se hace revisión el día 3, 6 y el 7 se clasifican.

Mo= mórula

Bi= blastocisto inicial

Bl= blastocisto

Bx=blastocisto expandido

Bn= blastocisto no eclosionado

Be= blastocisto eclosionado.

La incubadora tiene condiciones adecuadas como 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂ a 38 grados centígrados a una presión de 5 mmHg.

5) Obtención de embriones viables para transferencia o congelación.

Ubicación geográfica

Ciudad Victoria, Tamaulipas cuenta con un clima (ACw) Semicálido subhúmedo con lluvia de verano, con una temperatura promedio de 22 a 24 grados, con una altitud 330 msnm, con una precipitación anual promedio de 800 a 1100 mm, cuenta con una vegetación de matorral, pastizal, selva baja con predisposición para la producción bovina.

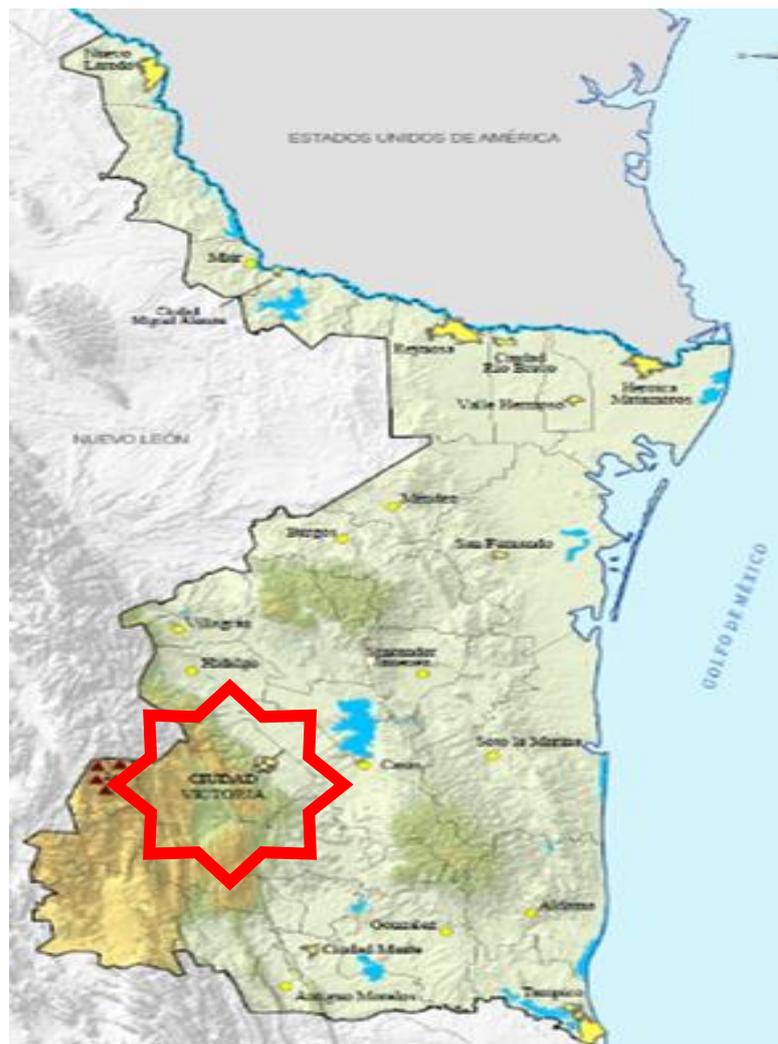


Figura 2. Mapa de Tamaulipas. (INEGI, 2018)

En Tamaulipas se encuentra al menos en 29% de superficie del territorio estatal con un clima de Trópico seco, Que en el territorio mexicano el Trópico seco puede representar alrededor del 23 % del territorio nacional. Siendo importante para muchos ganaderos y profesionales de la salud animal.

Datos recolectados.

Dentro del periodo marzo del 2018 a noviembre del 2019 se aspiraron 546 donadoras de diferentes razas. Se codificó de la siguiente manera: 0= Bos taurus, 1= Bos indicus y 2= Sintéticas.

La siguiente tabla muestra las abreviaciones de razas que se enlistan en las tablas y gráficas.

GRUPO GENÉTICO	RAZA	ABREVIATURA	NÚMERO DE DONADORAS
0	Aberdeen Angus	AA	4
0	Akaushi	AK	3
0	Angus Rojo	AR	11
0	Wagyu	WG	1
0	Charolais	CH	24
0	Hereford	HF	4
0	Piedmontese	PM	3
0	Suizo Europeo	SE	5

1	Brahman	BH	44
1	Brahman Rojo	BHR	2
1	Gyr	GYR	5
2	Beefmaster	BM	214
2	Brangus	BN	17
2	Brangus Rojo	BR	199
2	Charbray	CHB	2
2	Santa Gertrudis	SG	2
2	Simbrah	SH	3
2	Cruce entre 2 razas puras	F1	1
		TC	2

Cuadro 6. Abreviaturas de las razas del estudio clasificadas por grupo genético.

GRUPO GENÉTICO	# DONADORAS	%
BOS TAURUS	55	10.07
BOS INDICUS	51	9.35
SINTÉTICAS	440	80.58

Cuadro 7. Presencia de cada grupo genético en los datos recolectados marzo 2018 a noviembre 2019.

Podemos observar que hay un mayor número de razas sintéticas en las instalaciones, esto se debe al clima predominante de la región.

RESULTADOS

OPU

De las donadoras al menos sufrieron 1 aspiración durante el período mencionado, una vez realizada la OPU se obtienen complejos cúmulos ovocitos (COC) clasificados viables. Que presenten los valores completos en los registros en cuestión de los protocolos MIV, FIV y CIV.

Se realizaron 967 aspiraciones a partir de 546 donadoras con un promedio de 1.7 aspiraciones por donadora.

RAZAS CON MAYOR NÚMERO DE ASPIRACIONES

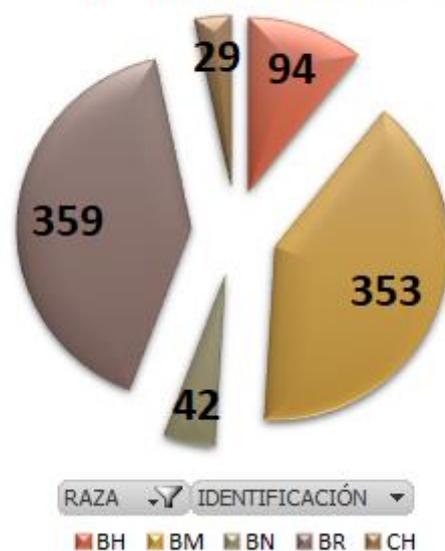


Figura 3. Gráfica de pastel donde se muestran las razas con mayor número de aspiraciones. 5 razas principales. 1. BRANGUS ROJO (359 aspiraciones), 2. BEEF MASTER (353 aspiraciones), 3. BRAHMAN (94 aspiraciones), 4. BRANGUS NEGRO (42 aspiraciones) y 5. CHAROLAIS (29 aspiraciones).

FRECUENCIA DE ASPIRACIONES.

A lo largo de la recolección de datos, un grupo de donadoras repitieron el procedimiento de la OPU por lo que en el siguiente cuadro muestra el porcentaje de donadoras lo hicieron.

REPETICIONES	ASPIRACIONES	%
PRIMERA	557	56.89
SEGUNDA	194	19.82
TERCERA	94	9.60
CUARTA	57	5.82
QUINTA	38	3.88
SEXTA	19	1.94
SÉPTIMA	13	1.33
OCTAVA	5	0.51
NOVENA	2	0.20
DÉCIMA	0	0.00
TOTAL	979	100

Cuadro 8. Se enlistan las diferentes aspiraciones que se llevaron a cabo a lo largo del periodo de marzo de 2018 a noviembre de 2019. Anexando el porcentaje que representa las donadoras que repitieron aspiraciones.

Posterior a la OPU se realizó la clasificación de todos los ovocitos recolectados, se clasificaron según los grados de viabilidad o si eran atrésicos.

ESTADIO	OVOCITOS	%
ATRÉSICO	664	3.16
DEGENERADO	1952	9.30
DESNUDO	4365	20.79
GI	716	3.41
GII	2467	11.75
Demás GIII	10827	51.58
TOTAL ASPIRADO	22717	100.00
VIABLES	15081	66.74

Cuadro 9. Clasificación y porcentaje de los ovocitos aspirados tras el proceso de OPU. Se obtuvo 66% de viables tras la aspiración. Tomando como viables GI. (Grado 1), GII. (Grado 2) y GIII. (Grado 3).

En el siguiente cuadro se obtuvo la producción promedio de ovocitos por grupo genético.

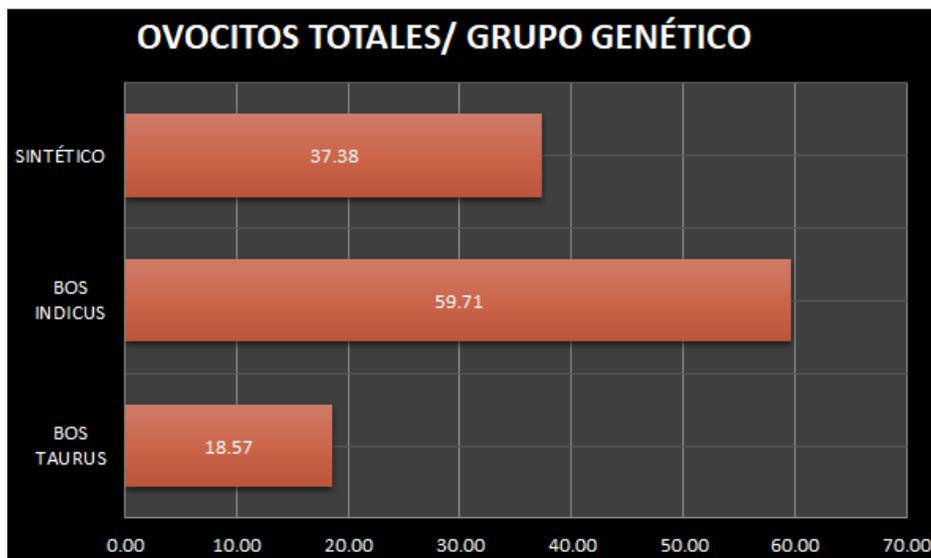


Figura 4. Promedio de ovocitos aspirados por OPU por grupo genético.

Posterior a esto se evaluó por grupo genético el porcentaje de viabilidad por aspiración folicular.

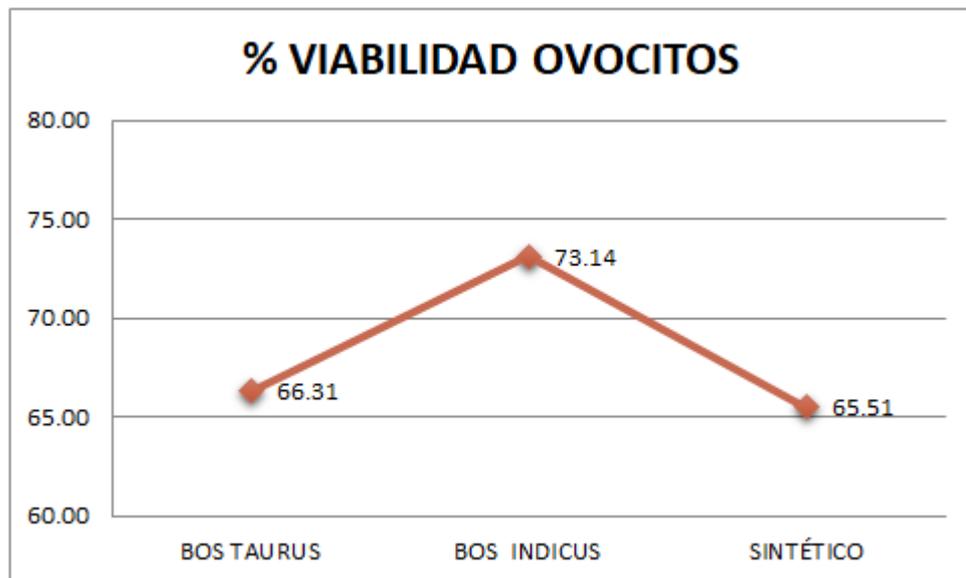


Figura 5. Porcentaje de ovocitos viables aspirados de los 3 grupos genéticos.

Posterior a la división por grupo genético se dividió por raza para determinar la viabilidad por cada raza en específico.

OVOCITOS TOTALES Vs VIABLES/ RAZA

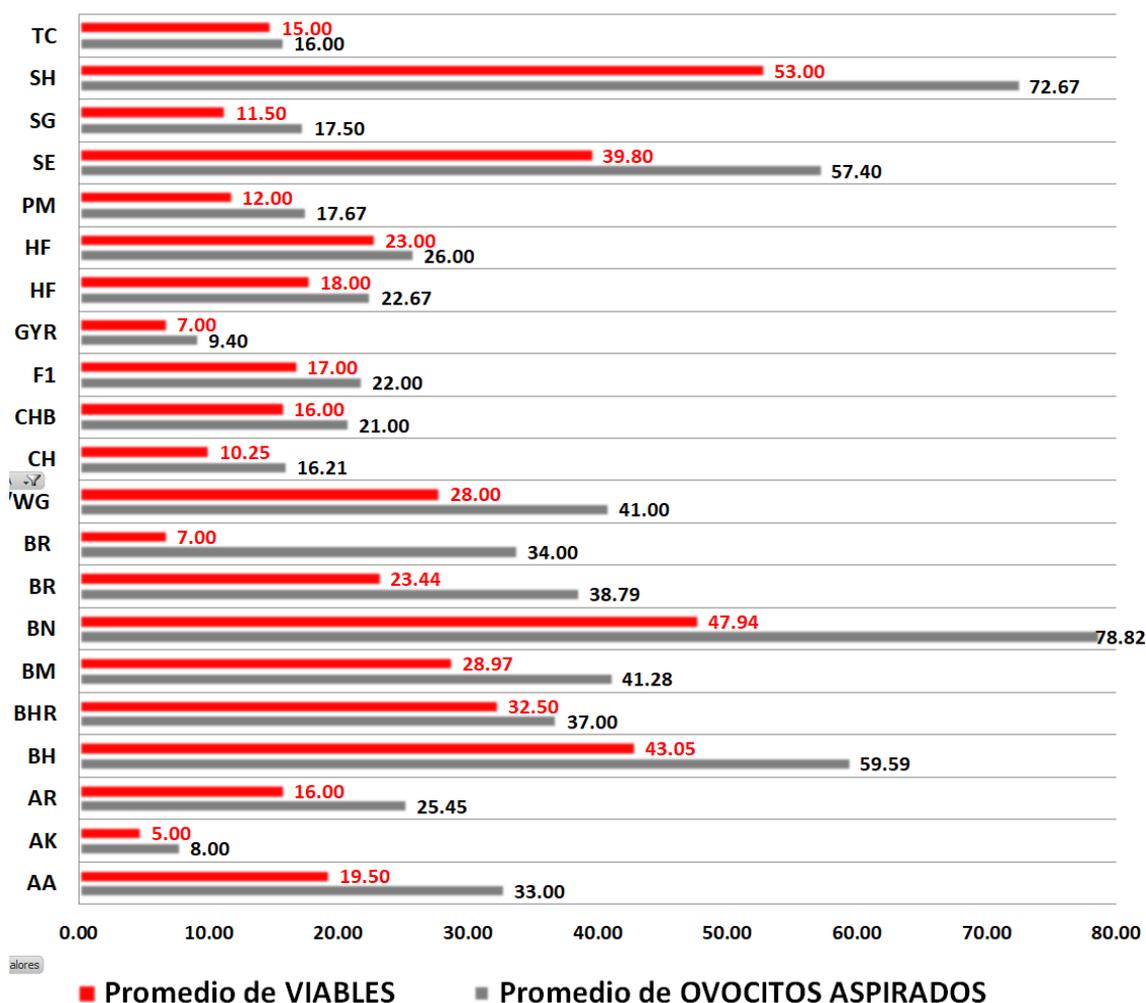


Figura 6. Producción promedio de ovocitos comparado con los viables clasificados por raza.

Se despliega la cantidad de ovocitos aspirados contra los ovocitos viables tras realizar la clasificación por los técnicos especializados. Donde se ve una producción superior de 20 ovocitos por OPU, datos que ya fueron confirmados con los resultados anteriores. Se ve la raza Brangus Negro (BN) como la raza que produce más ovocitos/OPU seguida por la raza Simbrah (SH) con 78.82 y 72.67 ovocitos respectivamente. Sin embargo la raza Simbrah cuenta con una cantidad mayor de ovocitos viables que la otra.

Posterior se realizó un análisis sobre la producción de COCs viables para iniciar el proceso de MIV a través de la repetitividad de las múltiples OPUs, las donadoras que superaron la segunda OPU tuvieron un incremento en la producción de COCs viables hasta llegar a un pico alcanzado en la sexta OPU.

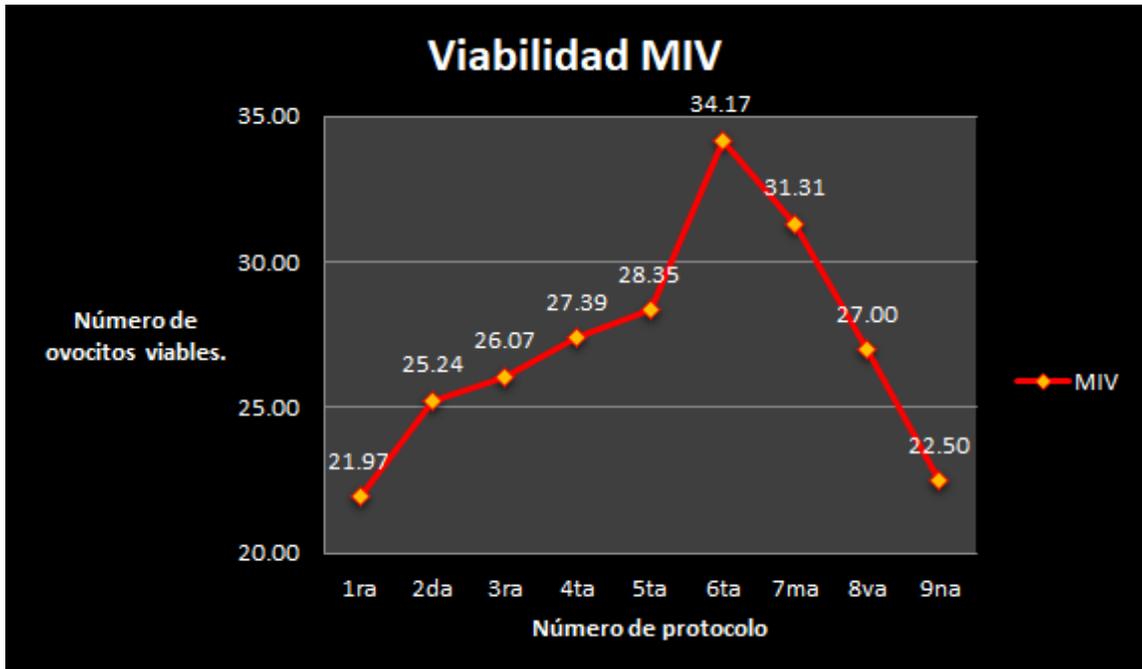


Figura 7. Muestra la viabilidad en porcentaje de los ovocitos de las donadoras que repiten a lo largo de 9 aspiraciones.

Para el protocolo CIV se evaluó la viabilidad de toda la etapa, que dura alrededor de 7 días, se obtuvieron promedios de las bajas y de los embriones producidos al final de todo el proceso.

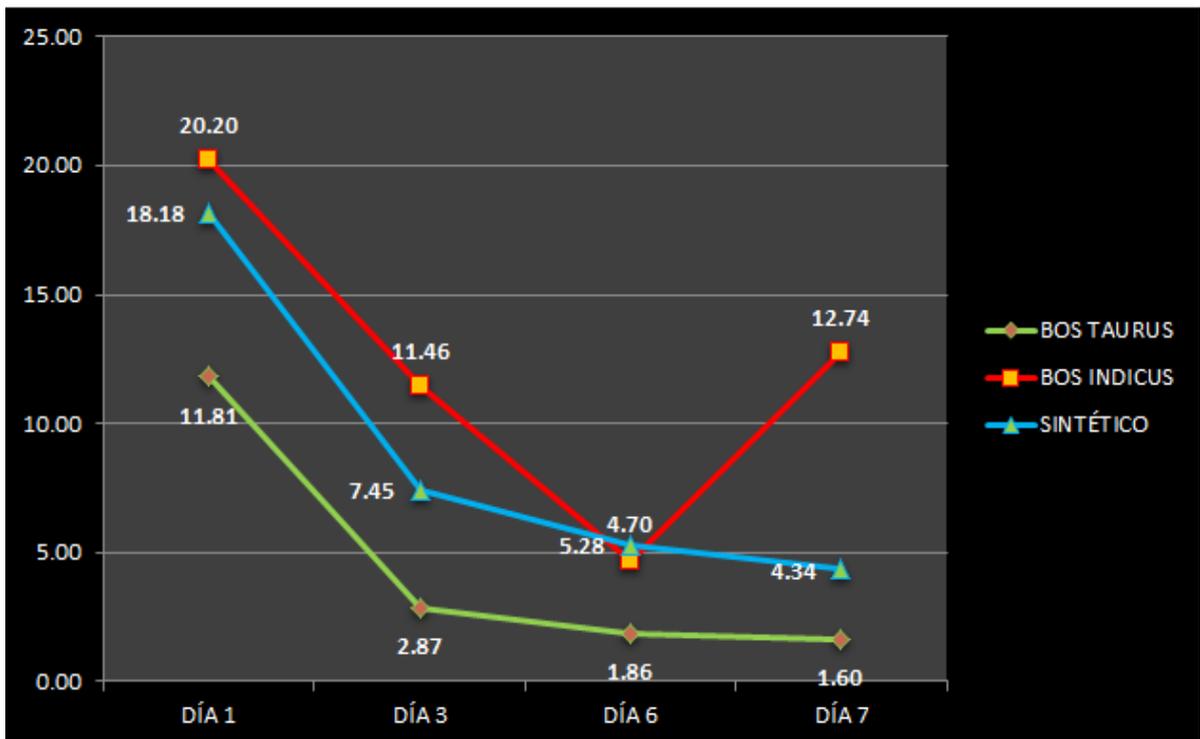


Figura 8. Se muestra el desarrollo de los grupos genéticos tras el protocolo de CIV en embriones producidos hasta el día 7.

La gráfica muestra el desarrollo de cada grupo genético a lo largo de CIV donde existe un decremento similar en los grupos genéticos hasta el día 6, donde el grupo de *Bos indicus* es sobresaliente con la sobrevivencia de los embriones hasta el día 7, donde se hará la clasificación para obtener embriones viables para congelación y/o transferencia en fresco.

Sin embargo, en la clasificación final para seleccionar los embriones para criopreservación los ovocitos producidos por *Bos Indicus* tienden a bajar su porcentaje nuevamente, así como lo muestra la figura 9 que de 12.74 ovocitos viables que se obtienen solo 6.06 de esos son candidatos para la criopreservación. A comparación con los otros dos grupos genéticos que de los ovocitos obtenidos el día 7 en promedio son los mismos que son aptos para congelación.

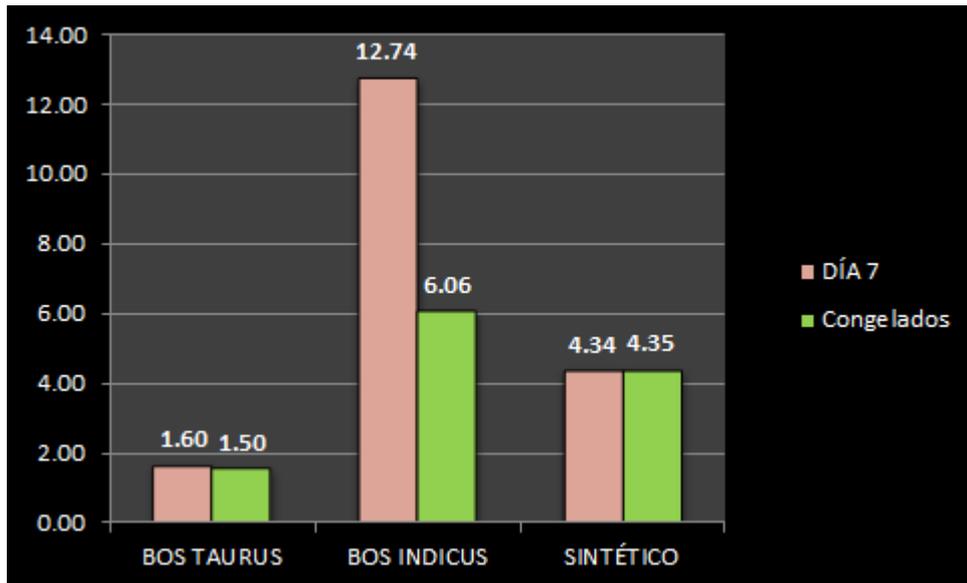


Figura 9. Se muestra el desempeño de los grupos genéticos tras el protocolo de CIV en el día 7 y los que están aptos para criopreservar.

Se ve la diferencia entre el número de embriones obtenidos en el día 7 de la CIV en comparación con los que se vitrifican.

En este trabajo no se evaluó la viabilidad para transferencia en fresco si no con las características para llevar la criopreservación, por lo que la siguiente figura nos permite ver la eficiencia total de cada grupo genético desde el momento en que se realizó la OPU hasta el momento que se clasifican para escoger los embriones disponibles para vitrificar.

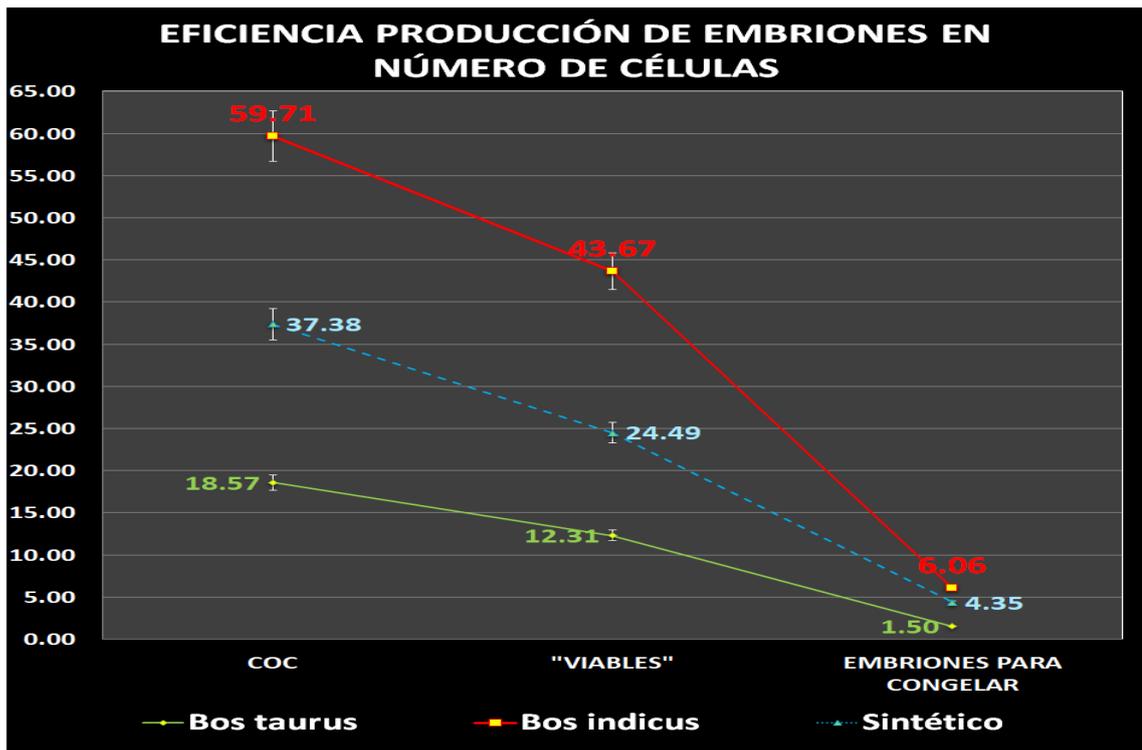


Figura 10. Comparación de la eficiencia por grupo genético para la producción de embriones viables tras todo el protocolo hasta antes de la congelación o transferencia.

La gráfica anterior muestra el total de células obtenidas tras la aspiración, los ovocitos clasificados como viables antes de empezar MIV y los embriones viables para congelar tras todos los protocolos. Se muestra que *Bos indicus* es superior en los total aspirados y viables pero menor en la eficiencia final con una producción de 6.06 embriones por aspiración en comparación con *Bos taurus* con una producción de 1.50 embriones viables y Sintético con una producción final de 4.35 embriones viables por aspiración.

El destino final de los embriones obtenidos en el periodo de tiempo mencionado fue 3, el predominante fue la vitrificación con el 72.41% (1071 embriones), en segundo lugar, se realizó la transferencia en fresco con el 27.45% (406

embriones) y el tercer destino fue criopreservación por curva lenta con el 0.14% de los embriones (2 embriones).

Se procedió a realizar el análisis ANOVA comparando la viabilidad de los COCs viables a lo largo de la CIV entre cada grupo genético

PORCENTAJE					
GRUPO GENÉTICO	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 6	DÍA 7	EMBRIONES VIABLES
BOS TAURUS	100.00	24.34	15.78	13.57	12.70
BOS INDICUS	100.00	56.70	23.25	63.08	29.98
SINTÉTICO	100.00	41.00	29.04	23.90	23.92

Cuadro 10. Porcentajes de supervivencia o viabilidad de los diferentes grupos genéticos a lo largo del protocolo CIV y la clasificación de embriones viables.

Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
DÍA 1	3	300	100	0	
DÍA 3	3	122.0489566	40.68298555	261.8742905	
DÍA 6	3	68.07271527	22.69090509	44.17546061	
DÍA 7	3	100.5439827	33.51466091	682.311835	
EMBRIONES VIABLES	3	66.60828438	22.20276146	76.88776507	

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	12557.93074	4	3139.482684	14.73590517	0.000338636	3.478049691
Dentro de los grupos	2130.498702	10	213.0498702			
Total	14688.42944	14				

Cuadro 11. ANOVA comparación de la viabilidad durante la CIV y la clasificación de los embriones entre Bos taurus, Bos indicus y Sintético. Con p=0.05 de error.

PORCENTAJE							
GRUPO GENÉTICO	COC	VIABLES PARA MIV	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 6	DÍA 7	EMBRIONES VIABLES
BOS TAURUS	100.00	66.31	63.60	15.48	10.04	8.63	8.08
BOS INDICUS	100.00	73.14	33.84	19.19	7.87	21.34	10.15
SINTÉTICO	100.00	65.51	48.63	19.94	14.12	11.62	11.63

Cuadro 12. Porcentajes de viabilidad de los diferentes grupos genéticos a lo largo de todo el protocolo desde la OPU hasta la obtención de embriones viables.

La viabilidad se evaluó al inicio de todos los procesos a los que se sometieron los COCs, en la etapa donde se ve una disminución considerable es en la MIV donde solo el 68.32 % (en promedio) de los COCs siguieron el proceso, después de esa etapa fue disminuyendo el porcentaje de ovocitos viables donde se ven diferencias específicas entre los grupos genéticos en la CIV. En *Bos taurus* disminuyó de 66.60 % en la MIV, para bajar al día 3 de la CIV a una viabilidad del 15.48% hasta un 8.08 % de viables después de la CIV, los que se podrían criopreservar. En *Bos indicus* de un 73.14% disminuyó a un 19.19 % en el día 3 de la CIV, para llegar a un 10.15 % final de viabilidad y por último en las Sintéticas de un 65.51 % disminuyó a un 19.94 % en el día 3 de la CIV para concluir con un 11.63 % de viabilidad final.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
TOTAL DE CÉLULAS ASF	3	300	100	0
VIABLES PARA MIV	3	204.964252	68.32141732	17.54779962
DÍA 1	3	146.06209	48.68736333	221.4617953
DÍA 3	3	54.60642317	18.20214106	5.687785886
DÍA 6	3	32.02526049	10.67508683	10.08137868
DÍA 7	3	41.59223339	13.8640778	44.19590975
EMBRIONES VIABLES	3	29.8564214	9.952140468	3.18730839

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	22150.44383	6	3691.740639	85.52427633	0.0000000032	2.847725996
Dentro de los grupos	604.3239552	14	43.1659968			
Total	22754.76779	20				

Cuadro 13. ANOVA comparación de la producción de células por aspiración, ovocitos viables y embriones viables entre Bos taurus, Bos indicus y Sintético. Con $p=0.05$ de error.

Tras el análisis estadístico de ANOVA se comparó entre grupos genéticos y existe diferencias estadísticas significativa al menos en un uno de los tres grupos genéticos. No existe diferencia estadística entre Bos indicus y Sintéticos con una $p=0.05520$ superior a $\alpha=0.05$ pero existe diferencia estadística entre Bos taurus y Sintético con una $p=0.0191$ inferior a $\alpha=0.05$.

Entre Bos taurus y Bos indicus también existe diferencia estadística significativa con un valor de $p= 0.03257$ superior a $\alpha=0.05$

DISCUSIÓN

OPU

Tras el análisis de los resultados se observó que tras cada OPU realizada a las donadoras los resultados son inferiores, pero no se encuentran muy alejados del promedio de Estados Unidos, sin embargo, no se consiguió una producción tan favorable de embriones para criopreservar y para obtener resultados más contundentes se necesitaría que la técnica sea puesta en práctica más de lo que ya se hace hoy en día. El lento crecimiento en el número de donadoras a las que se les practica la técnica FIV se podría deber a diversos y contables factores por lo que asociarlos a solo uno sería un error, por ejemplo puede influir desde los altos costos de la técnica, la baja cantidad de embriones viables obtenidos, la nula o poca disposición de los ganaderos para probar nuevas tecnologías, falta de profesionales altamente capacitados, la lejanía de las donadoras a las instalaciones o en su defecto deceso/venta de los animales de alta calidad genética.

El procedimiento de la OPU tiene la ventaja de poderse realizar de manera constante casi con el mismo resultado que la primera ocasión. Así pudiendo obtener mayor descendencia de una donadora superior antes de que se presenten problemas de baja producción de ovocitos o problemas de salud que impidan obtener material genético de calidad de cierta hembra.

Por lo que se observó tras el análisis no todas las donadoras repitieron el procedimiento de OPU más de una ocasión (el 56.89% del total de las OPU), tan solo el 19.82% repitió por segunda vez el protocolo. Conforme se hacían más repeticiones fue disminuyendo el porcentaje de las donadoras a las que se le

realizaba el protocolo de OPU, por lo que también teníamos menos donadoras a las que se les había realizado el protocolo FIV completo en más de una ocasión. Se observa del análisis que sólo en el 0.20% de las donadoras llegó a realizarse una novena aspiración. Se observa un incremento constante en la producción de ovocitos viables tras incrementar la repetitividad de las OPUs alcanzando un pico promedio máximo de 34.17 COCs por donadora. Sin embargo, el promedio de producción de COCs viables a través de todas las OPUs realizadas es de 27.11 COCs, esto significa una sobreproducción del 25.93% al alcanzar la sexta OPU. Después de la sexta aspiración el número de ovocitos promedio fue disminuyendo.

Después de realizar la OPU se deben clasificar los ovocitos según el grado de madurez o si están degenerados, de todas las aspiraciones se obtuvo que el 66.74% de los ovocitos aspirados son viables, este grupo se puede subdividir en 3 grupos (GI, GII y GIII) donde el grupo GIII con el 51.58% del total de ovocitos aspirados son los que dan mejores resultados tras el protocolo FIV.

Con estos datos pudimos conocer la producción promedio de ovocitos por grupo genético, donde está *Bos taurus* con una producción de 18.57 ovocitos/ OPU, *Sintéticas* con 37.38 ovocitos/OPU y *Bos indicus* con 59.38 ovocitos/OPU respectivamente. Teniendo como resultado los ovocitos viables por grupo genético, *Bos taurus* (66.31%) con 12.31 ovocitos viables/OPU, *Sintéticas* (65.51%) con 24.49 ovocitos viables/OPU y en *Bos indicus* (73.14%) con 43.43 ovocitos viables/OPU. Siendo el primer grupo genético el que tiene la menor producción de ovocitos viables, en segundo lugar, el grupo de razas Sintéticas con casi el doble de su producción y el grupo *Bos indicus* obtuvo casi 3 veces la producción de *Bos taurus*.

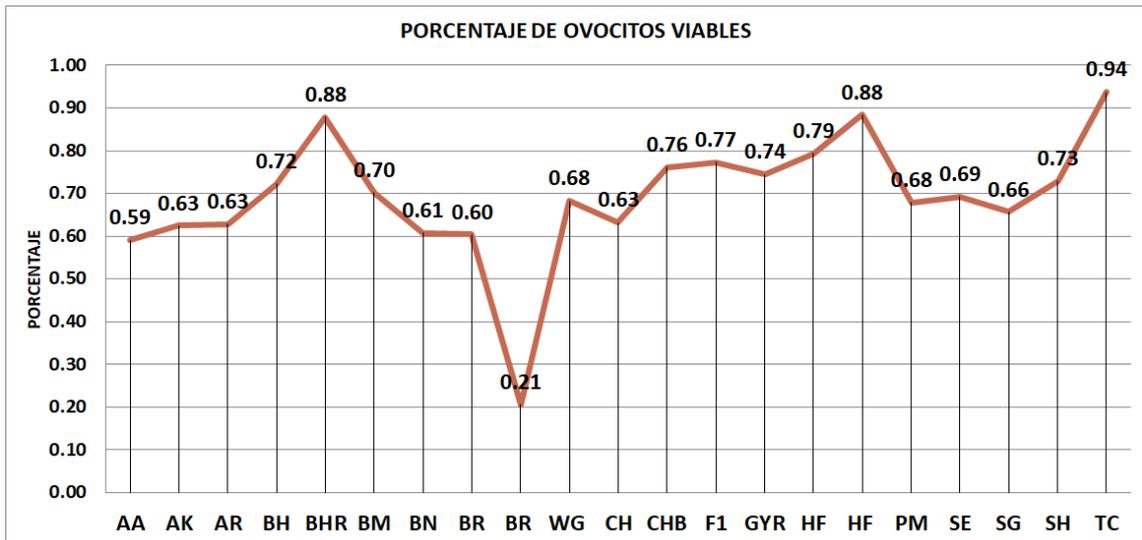


Figura 11. Comparación en porcentaje entre razas y su producción de ovocitos viables.

Al evaluar la eficiencia por razas se vio que las sobresalientes, la raza Hereford (HF) con una viabilidad superior al 79%, la raza Charbray (CHB) con un porcentaje del 76%, la raza Simbrah (SH) con un 73% de viabilidad, y la raza Brahman (BHR) tiene al menos 72% de viabilidad, esto sin contar animales F1 con un 77% de viabilidad. Confirmando así lo que se mencionó en resultados que la raza Simbrah es de las más productoras de ovocitos viables para FIV. Independiente de las variaciones de clima y estrés calórico que pudiera estar presente en razas *Bos taurus*.

MIV

En el análisis de todos los datos se observa que después de la clasificación de la OPU y al término de la MIV hubo una disminución en promedio del 31.68% de los ovocitos viables que entraron a la MIV. Por lo que de cada 27.11 ovocitos

que entraban solo salían en promedio 18.51 ovocitos que pasaban a la siguiente fase.

CIV

Tras la revisión de todos los protocolos podemos observar que en la etapa donde se encuentra la mayor disminución de ovocitos fue durante los días 3 al 6 de la CIV. Estos son los días más críticos ya que significan una disminución en promedio del 71.02 % de los ovocitos viables. Por lo que los medios de cultivos son indispensables para evitar atresia o descarte de los ovocitos durante esta etapa.

El análisis muestra una disminución en el porcentaje de los ovocitos viables a través de los días de la CIV. Sin embargo, podemos ver del día 6 al día 7 un incremento considerable en el grupo *Bos indicus*. De tener 4.7 de ovocitos viables en promedio el día 6 incrementa para el día 7 a 12.74 de ovocitos viables en promedio. Esto se puede deber a que existe un desarrollo un poco más lento a comparación de los otros dos grupos genéticos ya que al momento de revisar el día 6, hay un decremento muy marcado que para el día se repone de manera drástica o se podría explicar de forma que los ovocitos de *Bos indicus* son más resistentes a la oxidación por lo que pueden seguir madurando, aunque en las revisiones anteriores no se hayan visto cambios significativos.

Grupo genético	Día 1	Día 3	Día 6	Día 7
Bos taurus	100%	24.30%	15.75%	13.56%
Bos indicus	100%	56.73%	23.26%	63.07%
Sintético	100%	41.16%	29.17%	23.98%

Cuadro 14. Porcentaje de ovocitos viables a través del proceso CIV.

Se observa que el grupo genético *Bos indicus* es el que presenta una mayor producción de ovocitos viables en el día 7 con el 63.07% del 100% que inicia la CIV. A comparación de Sintéticos y *Bos taurus* con 23.98% y 13.56% respectivamente.

Al evaluar la eficiencia de la criopreservación por el método de vitrificación en cada grupo genético se observó que hay una disminución en el grupo genético de *Bos indicus*, se nota un decremento aproximado del 50%. Eso se debe a la clasificación que se realiza de los embriones para ver si serían aptos para criopreservación, aunque si su destino final fuera transferencia en fresco se vería la diferencia, ya que si producen más embriones el grupo genético *Bos indicus* a comparación de los otros dos. Los otros dos grupos genéticos prácticamente no se descartaron embriones tras la clasificación.

Como se observa en el cuadro 12, el porcentaje de embriones viables para vitrificación es de 11.63% en *Sintéticos* 10.15% en *Indicus* de 8.08% siendo al revés a comparación de embriones para transferencia en fresco. Tras el análisis estadístico se mostró que existe diferencia estadística entre la eficiencia de *Bos taurus* contra los otros dos grupos genéticos (*Bos indicus* y *Sintéticos*).

Esto tras ser evaluado a través de pruebas estadísticas como ANOVA y T de student se vio que no existe diferencia estadística entre *Bos indicus* y razas Sintéticas, sin embargo, si existe entre estas dos y *Bos taurus*. Dando como resultados que bajo las condiciones de clima y manejo el grupo genético *Bos taurus* se ve afectado en pequeña cantidad a comparación de los otros dos grupos genéticos que están mayores adaptadas a diferentes condiciones climáticas. Por lo que la producción de embriones in vitro si puede verse mermada.

Sin embargo, esto no indica que haya pérdidas en la producción de este tipo de ganado bajo condiciones de trópico seco, siempre y cuando las condiciones de manejo y alimentación sean las óptimas.

CONCLUSIONES

El análisis dio como resultado que se obtiene una mayor producción de ovocitos viables de una donadora por un número máximo de seis aspiraciones antes de tener una disminución en la producción. Por lo que se podría implementar una planeación para las donadoras, donde se alcance la sexta OPU sin ser inseminada o servida por toro para garantizar la máxima producción de ovocitos viables. Así, podríamos disminuir la presión para obtener buenos resultados sobre las donadoras, pudiendo causar problemas en el estroma ovárico, como infertilidad, y así logrando también gestaciones propias de las donadoras.

En la actualidad, es bien sabido que en la etapa de CIV hay una disminución drástica de los COCs, por lo que se trata de innovar e investigar nuevas variantes de medios de cultivo para favorecer el buen desarrollo de los ovocitos durante este proceso y este experimento no fue la excepción, sí se ve, que existen drásticos decrementos de los COCs viables tras los días que dura la MIV, en especial del día 1 al 3. Por lo que, es un reto tratar de conseguir o modificar los medios disponibles para disminuir la pérdida de material genético en esta etapa.

Se pudo evidenciar después del análisis de los datos de los tres grupos genéticos, que posiblemente hay una influencia mínima marcada por el medio ambiente, y/o la adaptabilidad. Ya que si bien existe una diferencia mínima entre los grupos genéticos *Bos indicus* y *Sintético* no existe diferencia estadística entre ambos grupos en comparación con el grupo *Bos taurus* se obtiene casi un 50% menos de embriones viables para criopreservar, donde si existe diferencia estadística; sin embargo, en cuestión del número de embriones viables para criopreservar para los tres grupos es casi el mismo. A diferencia de si se

comparan embriones viables tras el proceso de FIV, el grupo sobresaliente es *Bos indicus*; lo cual tampoco indica que se obtenga un mayor porcentaje de mantenimiento de una gestación y/o partos, ya que puede tener más problemas durante la implantación, post transferencia, por problemas en el ambiente uterino, o falta de moléculas antioxidantes que evitan que se degeneren.

El tener una mínima superioridad en la eficiencia final puede verse influido a que los grupos genéticos *Bos indicus* y Sintéticas son más adaptables en el clima cálido subhúmedo en el que están las donadoras, sería bueno reevaluar la eficiencia de los grupos genéticos en otro tipo de clima más favorable para *Bos taurus* para ver si la diferencia se incrementa o no. Para así poder obtener qué influencia pudiera ejercer el clima.

REFERENCIAS

- AETE. (2012). National Statistic Data of the Embryo Transfer activity. 28th Scientific Meeting of the AETE, Saint-Malo (France), 43-54.
- AETE. (2019). National Statistic Data of the Embryo Transfer activity. 28th Scientific Meeting of the AETE, Saint-Malo (France), 43-54.
- Avery B y T Greve. Impact of percoll on bovine spermatozoa for in vitro insemination. *Theriogenology*. 1995. 44, 871-878
- Bols P, Vandenheende JMM, A VS, Kruif A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*. 1995;43:677–687.
- Bedford JM. The influence of oestrogen and progesteron on sperm capacitation in the reproductive tract of the female rabbit. *J Endocrinol*. 1970. 46, 191-197.
- Bedford JM. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic Event. *Biol Reprod*. 1998. 59, 1275-1287.
- Bonilla León, L. et al. (2018) “Viabilidad y tasa de preñez de embriones producidos in vitro a partir de semen sexado comparado con semen convencional en *Bos taurus* y *Bos indicus*,” *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 29(4), pp. 1377–1385.
- Brackett RG and JB Server. Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus *Fert Steril*. 1970. 21, 687-695.

- Brackett, R.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., et al. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27, 147-158.
- Bruyère P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guérin P, Louis G, Buff S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*. 2012;78(6):1294–302.
- Caamaño JN, Gómez E, Trigal B, Muñoz M, Carrocera S, Martín D, et al. Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*. 2015;83(5):881–90.
- Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Sá, W.F., Ferreira, A.M., Ramos, A.A., et al. (2006). Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, 3(1), 19-28.
- Colazo, M. G. and Mapletoft, y. R. J. (2013) Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos, Com.ar. Available at: https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/31-aplicaciones_20-37.pdf
- Dominiko and First. Maturation of denuded bovine oocytes result in normal fertilization and development. *Biol Reprod*. 1991; 44 (Supl 1) 353.
- (2013). Estado actual de los sistemas de producción de embriones en ganado bovino. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Serida.org. Available at: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=5572>

- Farin PW, Britt JH, Shaw DW, Slenning BD. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*. 1995;44(3):339–49.
- Fei W, Zhong L, Ta MT, Shui G, Wenk MR, Yang H. The size and phospholipid composition of lipid droplets can influence their proteome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;415(3):455–62.
- Fernández, A., Díaz, T. and Muñoz, G. (2007) “Producción In vitro de Embriones Bovinos,” *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinaria*, 48(1), pp. 51–60.
- Filipiak Y, Larocca C. Manual de Fertilización in vitro en Bovinos. In 2010.
- Freshney I. The culture environment, In: *Culture of animal cells, A manual of basic technique*. AR Liss, New York. 1987; 57-84.
- Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-1357.
- Gil Magaña AR, Sedano Canseco R, Montiel Palacios F, Zárate Guevara OE. Efecto del método de criopreservación sobre el desarrollo in vitro de embriones bovinos producidos in vivo. In 2011.
- Gonella Diaza AM., Atuesta J., Bernal S., Chacón L., (2013). Resumen de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, Vol 4. 1
- Gonçalves, P.B.D., Visintin, J.A., Oliveira, M.A.L, Mon-tagner, M.M. & Costa, L.F.S. (2001). Produção in vitrod e Embriões. En: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. (Ed.), *Bioteecnias aplicadas á reprodução animal* (pp. 195-226). São Paulo: Livraria Varela.

- Goodman JM. The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28005–9.
- Hamatani, T., Yamada, M., Akutsu, H., Kuji, N., Mochi-maru, Y., et al. (2008). What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? *Reproduction*, 135, 581–592.
- Herms A, Bosch M, Ariotti N, Reddy BJN, Fajardo A, Fernández-Vidal A, et al. Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Curr Biol.* 2013;23(15):1489–96.
- Hosoe M and Y Shioya. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex Zygote. 1997; 5, 371-376.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H and T Greve. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology.* 1997; 47, 23-32.
- INEGI, 2018. Aspectos geográficos Tamaulipas.
- Keefer CL and AM Paprocki. Effect of percoll following sperm separation on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1995; 43, 244.
- Latham, K.E., Akutsu, H., Patel, B. & Yanagimachi, R. (2002). Comparison of gene expression during preim-plantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 67(2), 386-392.
- La transferencia de embriones en bovinos (no date)
Portalveterinaria.com. Available at:
<https://www.portalveterinaria.com/rumiantes/articulos/14123/la-transferencia-de-embriones-en-bovinos.html>.
- Liebfried, L., First, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci.* 1979;48: 76-86.

- Lde P, Jmj A, Al M, Pj A, Aml T, W C. Lipid droplets in clusters negatively affect *Bos indicus* embryos during cryopreservation. In. 2018;1–9.
- L. NT, A. D, W. G, R. DJ, C. TX, X Y. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. Vol. 62. 2004. p. 437–449.
- Matínez Bello, D. (2007). Situación actual de la transferencia embrionaria. Frisona Española. 164.
- Machaty Z., Peippo J., Peter A. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology* 78: 937-950.
- Mapletoft, R.J., 2013, History and perspectives on bovine embryo transfer. Westem College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, *Anim. Reprod.* Vol. 10, p. 168-173.
- Overstöm EW. *In vitro* assessment of embryo viability. *Theriogenology*. 1996; 45, 3-16.
- P. LDE, A. JMJ, Miguel AL, A. PJ, T. AML, Chris W, et al. Lipid droplets in clusters negatively affect *Bos indicus* embryos during cryopreservation. In 2018. p. 1–9.
- Palma GA. Producción in vitro de embriones bovinos. 2018. p. 225-273.
- Palma GA and G Brem. Effect of high concentrations of IGF-I on the development of in vitro produced bovine embryos. *Arch Anim Breed.*1996;39, 85.
- Palma GA, J Mödl and G Brem. The influence of different combinations of bovine LH and bovine FSH on the maturation of cattle oocytes. *Reprod Dom Anim.* 1997;32, 81.

- Parrish JJ, JL Parrish and NL First. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biol Reprod.*1984; 30 (Suppl 1) 112.
- Pérez-Torres L, Orihuela A, Corro M, Rubio I, Cohen A, Galina CS. Maternal protective behavior of zebu type cattle (*Bos indicus*) and its association with temperament. *J Anim Sci.* 2014;92(10):4694–700.
- Peippo, J., Machaty, Z. & Peter, A. (2011). Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. *Theriogenology*,76(8), 1373-1379
- Rodgers RJ, Wezel IL, Lavranos TC, Rodgers HF, Cm I, Krupa M. Developmental changes in cells and matrix during follicle growth In. In: Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L, editors. 1998. p. 85–98.
- Sirard, M.A. (2011). Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(6), 483–488
- Takahashi, Y. & First, N.L. (1992). In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*,37(5), 963-978
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Korsawe, K., et al.(2004). Gene expression patterns in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Animal Reproduction Science.* 82-83, 593–603

FIGURAS

- Figura 1. Eficiencia de la producción in vitro de embriones bovinos en gran escala (Adaptado de Palma, 2018)
- Figura 2. Mapa de Tamaulipas. (INEGI, 2018)
- Figura 3. Gráfica de pastel donde se muestran las razas con mayor número de aspiraciones. 5 razas principales. 1. BRANGUS ROJO (359 aspiraciones), 2. BEEF MASTER (353 aspiraciones), 3. BRAHMAN (94 aspiraciones), 4. BRANGUS NEGRO (42 aspiraciones) y 5. CHAROLAIS (29 aspiraciones).
- Figura 4. Promedio de ovocitos aspirados por OPU por grupo genético.
- Figura 5. Porcentaje de ovocitos viables aspirados de los 3 grupos genéticos.
- Figura 6. Producción promedio de ovocitos comparado con los viables clasificados por raza.
- Figura 7. Muestra la viabilidad en porcentaje de los ovocitos de las donadoras que repiten a lo largo de 9 aspiraciones.
- Figura 8. Se muestra el desarrollo de los grupos genéticos tras el protocolo de CIV en embriones producidos hasta el día 7.
- Figura 9. Se muestra el desempeño de los grupos genéticos tras el protocolo de CIV en el día 7 y después de la clasificación para seleccionar a los embriones viables para congelar.
- Figura 10. Comparación en porcentaje entre razas y su producción de ovocitos viables.

- Figura 11. Comparación de la eficiencia por grupo genético para la producción de embriones viables tras todo el protocolo hasta antes de la congelación o transferencia.

CUADROS

- Cuadro 1. Número de embriones transferidos y congelados por medio convencional (in vivo) 2018 en Estados Unidos (AETE, 2019).
- Cuadro 2. Número de embriones producidos en Estados Unidos y la comparativa de su destino, 2018 (AETE, 2019).
- Cuadro 3. Número de OPUs realizadas en laboratorios FIV en Estados Unidos, realizadas con preparación de FSH o sin ella, 2018 (AETE, 2019).
- Cuadro 4. Eficiencia de embriones producidos por FIV en Estados Unidos, 2018 (AETE, 2019).
- Cuadro 5. Clasificación de COCs (Liebfried I. y First N. L., 1979; Sato E. y col., 1990)
- Cuadro 6. Abreviaturas de las razas del estudio clasificadas por grupo genético.
- Cuadro 7. Presencia de cada grupo genético en los datos recolectados marzo 2018 a noviembre 2019.
- Cuadro 8. Se enlistan las diferentes aspiraciones que se llevaron a cabo a lo largo del periodo de marzo de 2018 a noviembre de 2019. Anexando el porcentaje que representa las donadoras que repitieron aspiraciones.
- Cuadro 9. Clasificación y porcentaje de los ovocitos aspirados tras el proceso de OPU. Se obtuvo 66% de viables tras la aspiración. Tomando como viables GI. (Grado 1), GII. (Grado 2) y GIII. (Grado 3).
- Cuadro 10. Porcentajes de supervivencia o viabilidad de los diferentes grupos genéticos a lo largo del protocolo CIV y la clasificación de embriones viables.

- Cuadro 11. ANOVA comparando la viabilidad durante la CIV y la clasificación de los embriones entre Bos taurus, Bos indicus y Sintético. Con $p=0.05$ de error.
- Cuadro 12. Porcentajes de viabilidad de los diferentes grupos genéticos a lo largo de todo el protocolo desde la OPU hasta la obtención de embriones viables.
- Cuadro 13. ANOVA comparando la producción de células por aspiración, ovocitos viables y embriones viables entre Bos taurus, Bos indicus y Sintético. Con $p=0.05$ de error.
- Cuadro 14. Porcentaje de ovocitos viables a través del proceso CIV.