

**Producción *in vitro* de embriones bovinos y su aplicación
en el mejoramiento genético y en la conservación de
especies.**

Estudiante
Isabella Gómez Cabrera

Directora
Viviana Torres Osorio PhD

Trabajo de Grado
En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Biología
Universidad CES
Medellín
Octubre 2022

Producción *in vitro* de embriones bovinos y su aplicación en el mejoramiento genético y en la conservación de especies.

Isabella Gómez Cabrera

Resumen

La producción *in vitro* (PIV) de embriones, ha sido una herramienta dentro de las tecnologías reproductivas que va en aumento de manera significativa gracias a su uso en los hatos ganaderos para mejorar la producción de animales de importancia comercial. Sin embargo, la PIV de embriones bovinos ha sido utilizada, también como modelo para diversas investigaciones a nivel genético, celular y metabólico de los mamíferos no roedores ya que comparten similitudes en mecanismos como la foliculogénesis, maduración de ovocitos y envejecimiento. Gracias a dichas características compartidas, la extrapolación de información encontrada en la PIV de bovinos, facilita su utilización en la PIV de otras especies, tanto de interés comercial como para mejorar los planes de conservación de especies en decrecimiento poblacional. La PIV consta de tres pasos: maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV) de los embriones, siendo relevante resaltar que, para garantizar la eficacia del proceso, es importante garantizar la calidad del ovocito y su maduración como punto de partida. La pasantía se realizó en las instalaciones de la universidad CES, sede Sabaneta en el laboratorio de Biotecnología en Salud, en donde inicialmente se realizó la colecta de ovarios de hembras bovinas faenadas en la planta de Beneficio de la Central Ganadera (Medellín). Ahí se recibió una capacitación para la manipulación y colecta de material biológico por parte del personal de la planta. Posteriormente se aprendió sobre selección y maduración de ovocitos, métodos de evaluación y separación espermática para su uso en procesos de FIV con semen congelado de toros de granjas donantes y finalmente, se trabajó en cultivo *in vitro* y evaluación de estadios embrionarios. De manera complementaria, se aprendieron técnicas moleculares como herramienta de diagnóstico reproductivo (PCR y electroforesis) y tinción de embriones bovinos.

Palabras clave: Biotecnología reproductiva, Bovinos, Embriones, Fertilización *in vitro*, Maduración *in vitro*.

Contenido

1. PRESENTACIÓN	5
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN	7
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 OBJETIVO GENERAL	7
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4. LOGROS ALCANZADOS	7
5. DIFICULTADES	8
6. RESULTADOS	8
6.1 RECOLECCIÓN DE OVARIOS Y ASPIRACIÓN DE OVOCITOS	8
6.2 SELECCIÓN DE OVOCITOS	9
6.3 MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV)	11
6.4 FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i> (FIV).....	12
6.5 CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV)	15
6.6 TÉCNICAS MOLECULARES	16
6.7 JOURNAL CLUB Y ACADEMIC COFFEE BREAK	17
6.8 EMBRIONES BOVINOS	17
6.9 CREACIÓN DE MATERIAL DIDÁCTICO.....	20
7. CONCLUSIONES	20
8. RECOMENDACIONES:	20
9. ANEXOS	21
10. BIBLIOGRAFÍA.....	21

1. Presentación

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) han venido siendo utilizadas exponencialmente en las últimas décadas en animales y humanos, ya que brindan herramientas que permiten el mejoramiento genético y ayudan al aumento del tamaño poblacional (Thongphakdee *et al.*, 2020). Las TRA se han implementado en reforzar los planes de conservación en especies afectadas por la alarmante situación actual sobre la pérdida de biodiversidad, en su mayoría resultado de las actividades antrópicas (Torres *et al.*, 2022), esta implementación ha sido pertinente, debido a que ayudan con la pérdida de variabilidad genética en poblaciones pequeñas y representan una herramienta para mantener poblaciones lo más parecidas posible a una población silvestre sana genéticamente diversa (Benham, 2022).

Dentro de las TRA, encontramos la crio-preservación (Congelamiento de tejido vivo), inseminación artificial, la transferencia de embriones y la producción *in vitro* (PIV) de embriones. Se ha observado un aumento en la utilización de TRA en los hatos ganaderos, resaltando la implementación de PIV como herramienta para generar un alto porcentaje de embriones bovinos a nivel mundial ya que permite generar un alto número de embriones que resultan en animales con mejor características genéticas y proporciona una alternativa frente la probabilidad de descartar ovocitos de alto valor genético (Vázquez *et al.*, 2014; Gonella *et al.*, 2013).

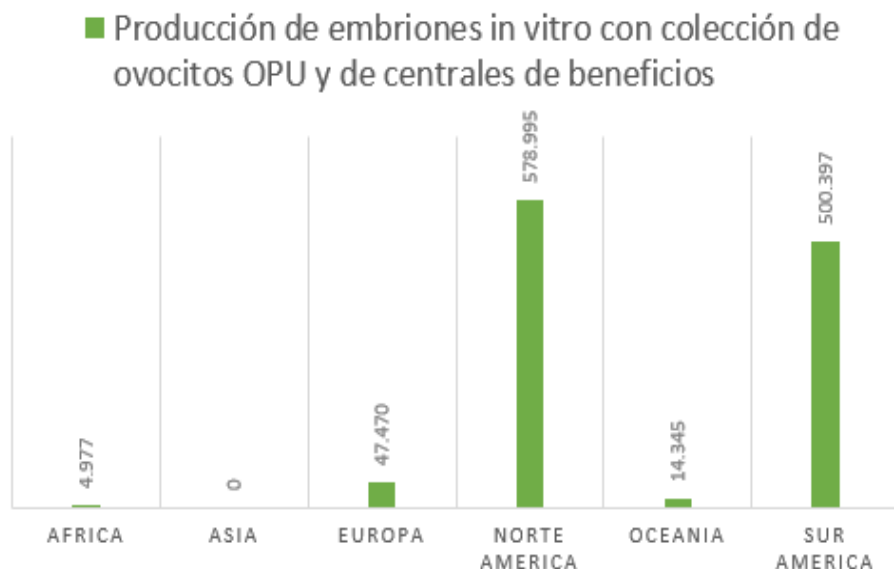
Además de que la PIV es altamente utilizada en sistemas de producción animal, en bovinos ha sido utilizada también como modelo guía para la investigación de procesos metabólicos, genéticos y del desarrollo de embriones de algunas especies de mamíferos no roedores en los últimos años (Gonella *et al.*, 2013), esto dado que los embriones bovinos simulan mecanismos como la foliculogénesis, maduración de los ovocitos y envejecimiento de la mayoría de los mamíferos no roedores, incluyendo el humano (Leidenfrost *et al.*, 2011). Por esta razón se facilita la extrapolación de la información encontrada en embriones bovinos hacia la PIV de otros mamíferos.

La PIV implica la maduración de ovocitos *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV), sin embargo, el proceso comienza con la aspiración folicular (Gallegos *et al.*, 2022). La obtención de los ovocitos bovinos se puede hacer de animales de pie, no obstante, se requiere profesional capacitado para la intervención quirúrgica y de la disponibilidad de animales para este propósito. Por otra parte, se pueden obtener ovarios de vacas faenadas de las centrales de beneficio, que, aunque presentan una alta variedad en la calidad de los ovocitos recolectados, representan una buena opción para proyectos de investigación (Quispe *et al.*, 2018; Gonella *et al.*, 2013; Baez *et al.*, 2010).

Investigaciones recientes señalan que es fundamental priorizar, las condiciones de maduración del ovocito para garantizar un buen desarrollo del embrión y asegurar la eficacia del proceso (Quispe *et al.*, 2018; Vázquez *et al.*, 2014). Las características morfológicas del complejo *cumulus-ovocito* (COC's) son un parámetro sustancial para

evaluar dicha calidad. Los COC's con al menos 3 capas compactas de células del cumulus y con citoplasma homogéneo y tonalidad oscura han demostrado ser de alta calidad (Estrella *et al.*, 2017). La calidad del ovocito juega un papel importante en la expresión de los RNA mensajeros maternos (RNAm) ya que el ovocito inactiva la transcripción de proteínas durante la maduración nuclear, por lo que debe acumular los RNAm maternos necesario para iniciar el desarrollo embrionario post-fertilización hasta iniciar la activación del genoma embrionario (Baez *et al.*, 2010; Burrola & Gonzáles, 2015; Graf, 2014). La MIV en bovinos requiere de 18 a 24 horas y se relaciona la reanudación de la meiosis y la liberación del corpúsculo polar, siendo esta liberación un indicador de correcta maduración (Gonella *et al.*, 2013; Baez *et al.*,2010).

Hace aproximadamente 40 años, inició la fertilización *in vitro* de manera comercial y en 1981 nació el primer ternero nacido bajo la técnica FIV, que hoy en día está teniendo alta aplicabilidad en Colombia. Pese a esto, no hay alto flujo de publicaciones de estos datos, con los cuales se logre posicionar al país en la aplicación de TRA en producción dentro del sector ganadero (Bonilla *et al.*, 2019). Según La Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés), la PIV ha aumentado un 13.2% a nivel mundial y para el año 2020 se tenían datos de países latinoamericanos como Brasil, Argentina, Colombia y Paraguay, contribuyendo así al aumento de la implementación de esta herramienta y evidenciando los resultados positivos de su implementación en las entidades investigativas y gremios ganaderos en Colombia (Ramirez,2020).



Gráfica 1. Producción de embriones *in vitro* con ovocitos recolectados por OPU y en centrales de beneficio por región en 2020 (Joao HM Viana – IETS Data Retrieval Committee)

La PIV de embriones bovinos, no solo beneficia a la producción comercial, si no que fortalece los programas de investigación. No obstante, Colombia tiene un índice bajo de PIV

de embriones, haciendo necesario reforzar la investigación en procesos como la maduración de ovocitos, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*, de modo que ayude a modernizar los hatos ganaderos colombianos a nivel zootécnico con las TRA (Espejo, 2018; Ramírez, 2020). Es necesario profundizar en la ejecución de estas tecnologías, las cuales se pueden implementar en los planes de conservación de fauna silvestre en declive o en riesgo, en los hatos ganaderos aumentando la disponibilidad de alimentos y optimización del uso de suelos, así como en y los humanos en programas de reproducción asistida (Gonella *et al.*, 2013).

2. Reseña de la institución

El laboratorio de Biotecnología en Salud de la universidad CES, sede Sabaneta, es un apoyo para investigaciones de la Facultad de Ciencias y biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, la Facultad de Odontología y la Facultad de Ingeniería. En este laboratorio trabajan las líneas de andrología, cultivo tisular y la línea de Embriología en la cual se llevó a cabo esta pasantía. El laboratorio cuenta con espacios y equipos adecuados para realizar procesos de evaluación y crío-preservación de semen animal y cuartos dotados para la realización de cultivos y maduración de ovocitos, propios para realizar la capacitación en técnicas de producción de embriones *in vitro*. (Universidad CES, s.f.)

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Adquirir conocimientos y destrezas en técnicas de producción *in vitro* de embriones bovinos

3.2 Objetivos específicos

-Clasificar de forma correcta los complejos *cúmulo-ovocito* bovinos aptos para lograr una maduración *in vitro*

-Adquirir destrezas en la evaluación y métodos de separación espermática para la realización de una fertilización *in vitro* y producción de blastocistos bovinos

-Elaborar protocolos de maduración, fertilización, cultivo *in vitro* de embriones bovinos de forma detallada

-Desarrollar material de apoyo didáctico de protocolos PIVE con herramientas web

4. Logros alcanzados

Se logró cumplir con todos los objetivos establecidos inicialmente. De manera complementaria durante la pasantía, se abordaron técnicas moleculares como herramienta de diagnóstico reproductivo (extracción de RNA/DN, PCR y electroforesis) y tinción nuclear de embriones bovinos como parámetro de evaluación de la calidad embrionaria. Se dio inicio el 24 de enero y finalizó el 17 de junio del 2022, cumpliendo con 20 horas por semana, dando en total 240 horas realizadas para el cumplimiento de la práctica.

5. Dificultades

No se presentaron dificultades durante el desarrollo de la pasantía.

6. Resultados

6.1 Recolección de ovarios y aspiración de ovocitos

Los ovarios utilizados fueron recolectados de la planta de beneficio Central Ganadera de Medellín. Recolectaron entre 50 a 60 ovarios por semana y fueron transportados hacia el laboratorio de biotecnología CES en solución Salina (NaCl) al 0.9% a una temperatura entre 28-32°C. En el laboratorio, los ovarios fueron lavados con solución salina con el fin de eliminar patógenos que pudiesen ser fuente de contaminación y alterar el proceso. Posteriormente, se colocaron los ovarios al baño María a la misma temperatura que a la que llegan para mantenerlos a una temperatura constante y evitar un choque térmico que pudiese degenerar los ovocitos. Para la aspiración folicular (obtención de ovocitos) se usó una aguja calibre 18 y una jeringa de 10ml. Se aspiraron folículos de 3-8mm de diámetro, y el líquido folicular obtenido era depositado en tubos Falcon, que se mantenían en el baño María, para una posterior revisión y selección de ovocitos (Estrella *et al.*, 2017). Debido a la heterogeneidad de calidad, que representa la obtención de ovarios a partir de hembras faenadas (Figura 1), se encontraron ovarios con patologías a los cuales no se les realizaron aspiración para evitar la contaminación del proceso. Al finalizar los ovarios utilizados se separaron en una bolsa roja de desechos biológicos y se guardaron en el congelador a -80°C para terminar con el proceso de descarte por el laboratorio.

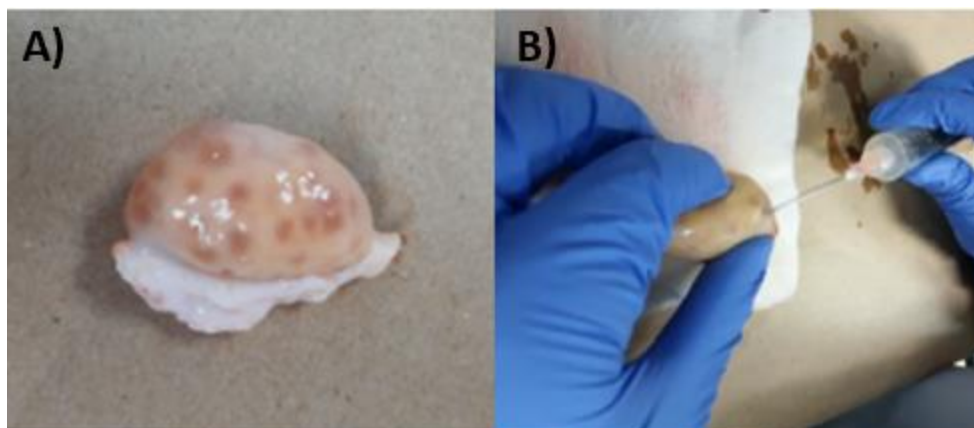




Figura 1. Ovarios recolectados de la planta de beneficio de Medellín. **A)** Ovario bovino con folículos aptos para la aspiración folicular. **B)** Aspiración folicular. **C)** Ovario bovino con cuerpo lúteo y hemorrágicos no aptos para aspirar **D)** Ovario con Enfermedad Inflamatoria Pélvica (EIA). **E)** Ovario con absceso. **F)** Ovario con folículo de +8mm no apto para aspirar.

6.2 Selección de ovocitos

Debido a la alta heterogeneidad de los ovarios de hembras faenadas, es necesario realizar una selección de los ovocitos aspirados, que representen una alta viabilidad para garantizar un correcto desarrollo a lo largo del proceso. La calidad morfológica está relacionada con la tonalidad del citoplasma y la presencia de las células del cumulus, las cuales son las que rodean al ovocito y cumplen la función de intermediación en la señalización hormonal mediada por el ovario y la hipófisis para asegurar una correcta madurez (Turathum *et al.*, 2021). Esta relación es tan estrecha que se llama el complejo *cumulus-ovocito* (COC) y las características morfológicas del COC es una las características, identificable visualmente, que determinan el potencial de maduración en el ovocito. Lo COC's se clasifican en tipo I, tipo II, tipo III y tipo IV (tabla 1), siendo los tipos I de mayor calidad y los tipos IV de menor calidad (Estrella *et al.*, 2017).

Clasificación	Descripción
I	Más de 4 capas compactas de las células del cúmulo, citoplasma oscuro homogéneamente.
II	De 1-3 capas compactas con citoplasma oscuro heterogéneamente.
III	Desnudo, sin células del cumulo y/o citoplasma no homogéneo.
IV	Cúmulo expandido.

Tabla 1. Tabla de clasificación de los COC's con la descripción morfológica (Velez *et al.*, 2017)

El líquido folicular obtenido y depositado en el Tubo Falcon, se dejó unos minutos en el baño María para que se decantaran los ovocitos y luego el precipitado se depositó en una caja Petri previamente marcada con una cuadrícula para facilitar la búsqueda de los ovocitos de mejor calidad. El material resultante se diluyó con PBS suplementado con albumina sérica bovina BSA (medio de selección) para una mejor observación. La selección se hizo usando un estereomicroscopio con platina integrada para mantener los ovocitos a una temperatura constante de 38° en el transcurso de la selección. Durante el proceso se recolectaron para madurar ovocitos tipo I y tipo II, sin embargo, se pudieron observar ovocitos de los cuatro tipos, ovocitos desnudos, ovocitos degenerándose u ovocitos apoptóticos (Figura 2B). Los ovocitos son sensibles a la exposición de la luz, los cambios temperatura, pH y la concentración de oxígeno, estos factores se tratan de controlar en la medida de lo posible a la hora de manipular los ovocitos en el laboratorio para disminuir especies reactivas de oxígeno y cambio metabólicos que afectan las tasas de desarrollo embrionario (Betancur, 2022). Por esta razón, el tiempo fue controlado y registrado en una hoja de seguimiento. La presencia de ovocitos apoptóticos aumentó a medida que transcurría el tiempo. Los ovocitos seleccionados se lavaron en medio de selección para eliminar los detritos celulares encontrados en el líquido folicular y posteriormente se colocaron en medio para maduración *in vitro* para continuar con el proceso.

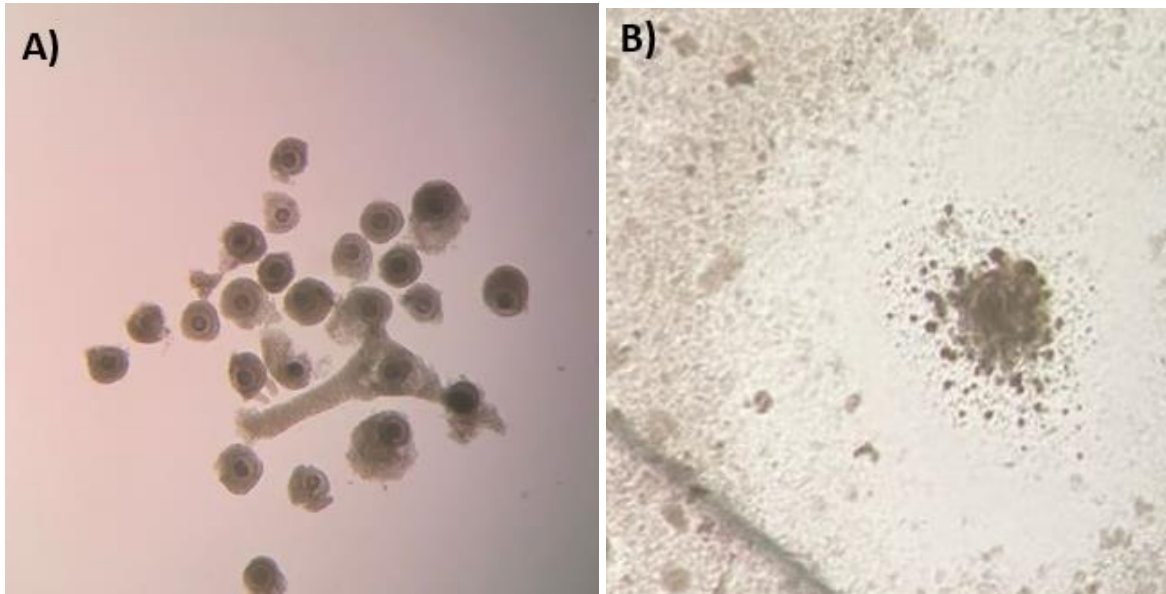


Figura 2. Imagen de ovocitos inmaduros. **A)** Ovocitos bovinos tipo I y tipo II; **B)** Ovocito bovino con células de la granulosa sufriendo apoptosis.

6.3 Maduración *in vitro* (MIV)

La maduración del ovocito conlleva cambios bioquímicos y estructurales a nivel nuclear y citoplasmático que llevan al ovocito ser apto para la fecundación (Gonella *et al.*, 2013). Es fundamental, garantizar las condiciones óptimas ya que la calidad del ovocito es determinante para la eficacia del proceso y puede verse afectada por el tiempo de exposición a la luz y composición del medio (Quispe *et al.*, 2018; Vásquez *et al.*, 2014). La maduración nuclear de los ovocitos comprende la eliminación del primer corpúsculo polar, la reanudación de metafase II y por la expansión de las células del cumulo (figura 3B) mediada por la producción del ácido hialurónico (HA) en el COC, la cual conlleva a una organización estructural y funcional de las células (Marei *et al.*, 2012; Ríos *et al.*, 2014). En la práctica, se cronometraron 2 horas desde el inicio de la aspiración folicular hasta el inicio de la maduración *in vitro*, para evitar exponer los ovocitos a cambios de temperatura, pH y exposición a la luz. Los COC's bovinos tipo I y II seleccionados se cultivaron por 24 horas en tubos con 500 μ l de medio MIV y 250 μ l de aceite mineral para evitar evaporación del medio y se dejaron en la incubadora a 5% de Co_2 y una temperatura a 38°C.

El medio MIV utilizado fue TCM.199 con sales Earle's y HEPES, un buffer que permite mantener un mínimo de cambios de pH que pueden alterar el proceso. El medio fue previamente gasificado 24 horas y suplementado con 10% desuero bovino fetal (SBF) que le permite al ovocito una correcta maduración, sin embargo, en concentraciones altas puede traer desventajas en el proceso afectando la calidad embrionaria (Urzi *et al.*, 2022). Además, se suplemento con 10 ng/ml Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) que juega un papel importante en la expansión de células del cúmulo y promueve la reanudación de la meiosis; 1 μ g/ml de Hormona folículo estimulante (FSH), que estimula la producción de HA,

facilita la capacitación espermática; 1 mM de Piruvato, que le confiere energía al ovocito y 1X de Antibiótico (Salgado *et al.*, 2013; Salgado *et al.*, 2010; Ferré, 2017).

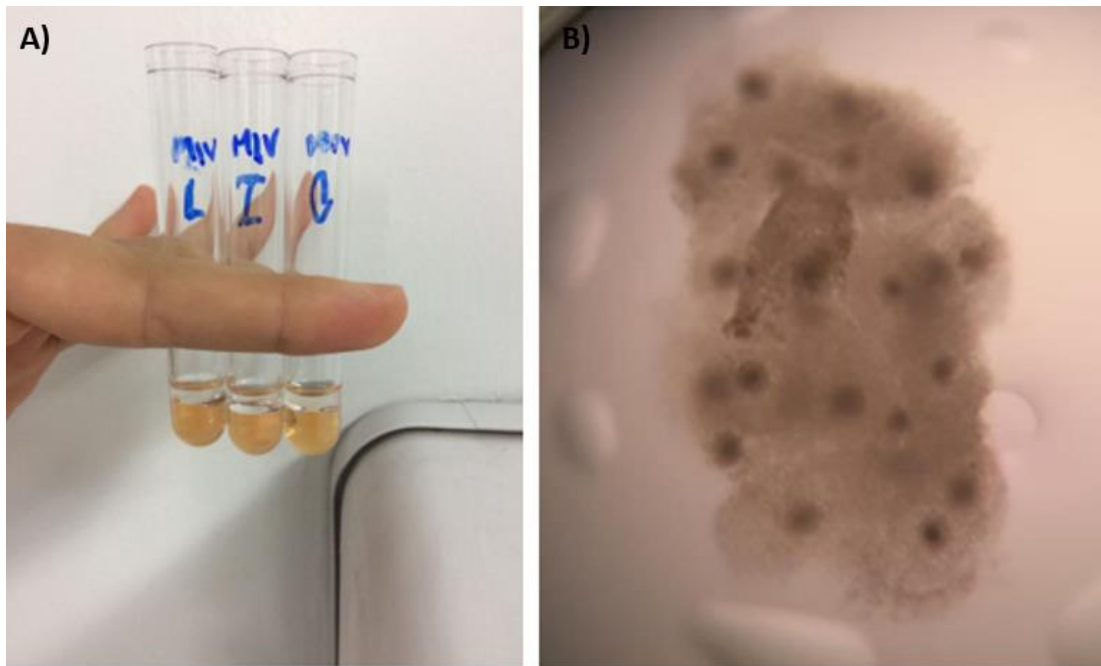


Figura 3. Imagen de ovocitos posterior a la maduración. **A)** Tubos de maduración pasadas las 24 horas con medio MIV de color rosa pálido. **B)** Ovocitos bovinos maduros con las células del cúmulo expandidas.

6.4 Fertilización *in vitro* (FIV)

El medio FIV TALP suplementado con 20 μM de penicilina, 10 μM de hipotaurina y 1 μM de epinefrina (PHE), que actúa como antioxidante y estimulante de la motilidad espermática y reacción acrosómica; Heparina que estimula la capacitación espermática y 1mM de Piruvato (Gonella *et al.*, 2013; Montes *et al.*, 2012). Pasadas las 24 horas de MIV, los ovocitos madurados *in vitro*, fueron lavados con medio FIV y se sembraron entre 9-15 ovocitos en cada gota de 50 μl FIV, donde se observaron los COC's expandidos y con características viscosas. Luego, el semen que se encuentra crio-preservedo y almacenado en los tanques de nitrógeno, se descongeló y capacitó mediante los gradientes de densidad, esto con el fin de generar cambios bioquímicos en los espermatozoides que resultan en la hiperactivación y faciliten la reacción acrosómica que finalmente conllevan a la fecundación del ovocito. La capacitación espermática se realizó a través del uso de gradientes de densidad de 90% y 45%, Bovipure depositados en un tubo eppendorf en ese orden y sobre estos se colocaron 500 μl de semen contenido en pajillas sin perturbar el gradiente. Posteriormente se centrifugó a 700 x g por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet fue reconstituido en 500 μl de medio FIV y centrifugado nuevamente a 700 x g por 5 minutos. Finalmente, el

pellet fue diluido con medio FIV a una concentración final de 2×10^6 spz/mL y a las gotas de fertilización se le adicionaron $10 \mu\text{l}$ de esta dilución.

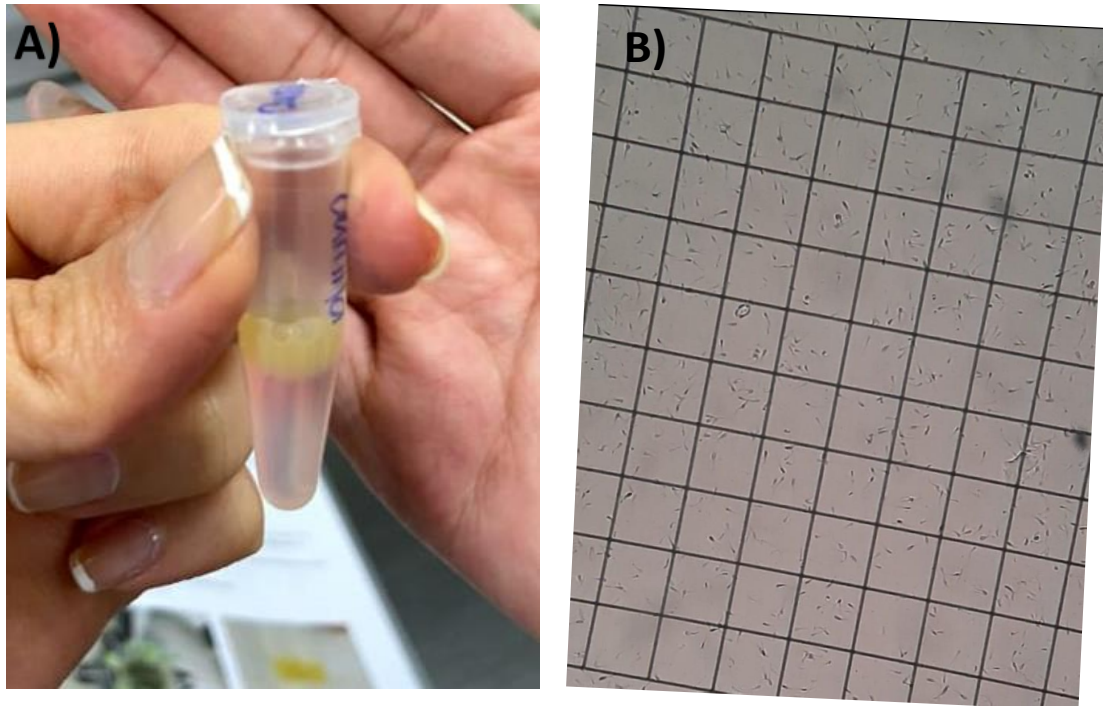


Figura 4. Imagen capacitación y evaluación espermática. **A)** Gradientes de capacitación espermática, la franja amarilla es el semen, la rosada el gradiente de 45% y el incoloro el gradiente de 90%. **B)** Cuadrícula de cámara Mackler con espermatozoides de toro Angus post-capacitación.

En el proceso post-capacitación es importante realizar el análisis de calidad espermática, ya que aproximadamente el 30% de los toros no son aptos para el proceso reproductivo *in vitro* por esto, la importancia de identificar toros con una evaluación reproductiva infértil o subfétil (Paéz & Corredor, 2014). Posterior a la capacitación se procedió a evaluar la motilidad y viabilidad del semen, mediante la cuantificación de concentración y motilidad espermática en la cámara Mackler. Se dispuso una gota de $10 \mu\text{l}$ de semen en la cámara Mackler previamente calentada y se contabilizó el número de espermatozoides en 10 recuadros para indicar la concentración en millones de espermatozoides por mililitro y se determinó el número de espermatozoides progresivamente móviles para indicar motilidad (Figura 4B). Con los datos encontrados y mediante la ecuación de la figura 5, se determinó la cantidad de medio FIV para adicionar en el semen anteriormente capacitado para garantizar una concentración de 200 millones de espermatozoides/mL. Al finalizar la cuantificación se procedió a fertilizar los ovocitos con una concentración final en la gota de 2×10^6 espermatozoides/mL usando el estereomicroscopio en campo oscuro. Posteriormente se incubaron a 5% de CO_2 y una temperatura a 38° durante 18-22 horas.

$$V = \left[\text{spz} \right]_X \frac{\text{Mot}}{10} x^{100-100}$$

Figura 5. Modelo matemático para calcular el volumen de medio FIV necesario para fertilizar con una concentración final de 2 millones de sp/ml

De manera complementaria se realizaron métodos para evaluar vitalidad espermática con eosina-nigrosina y funcionalidad de membrana con el test hipoosmótico HOST (figuras 6ª y 6B). Ambas pruebas evalúan la integridad de la membrana espermática, parámetro importante para una correcta fertilización (Bedoya *et al.*, 2003). Con la prueba HOST se determina el grado de funcionalidad y respuesta de la membrana espermática, es decir, si esta activa bioquímicamente, a través de cambios morfológicos en los flagelos de los espermatozoides como la hinchazón o enrollamiento de las colas como respuesta al cambio de osmolaridad de medio externo. El hinchamiento de las colas demuestra el correcto intercambio de medios intra y extraelular como indicador de integridad y funcionalidad de la membrana (Sánchez & Zamora, 2016).

Por otra parte, la vitalidad puede ser evaluada mediante tinciones como eosina-nigrosina, donde se determina la cantidad de espermatozoides vivos y muertos, gracias a que los espermatozoides muertos tienen una alta permeabilidad por fallas de la membrana plasmática y permiten el ingreso del colorante eosina que les aporta un color rosado, situación que no sucede con los espermatozoides vivos que permanecen incoloros por tener membranas intactas. La nigrosina por su parte, tiñe de color oscuro el fondo para facilitar la observación y el conteo de espermatozoides al ser colores contrastantes (Trujillo e Ibáñez, 2021; Sánchez & Zamora, 2016). En la práctica las evaluaciones de vitalidad se le realizaron a toros de razas Angus y Severa, con el fin de comparar morfología y vitalidad en ambos toros.

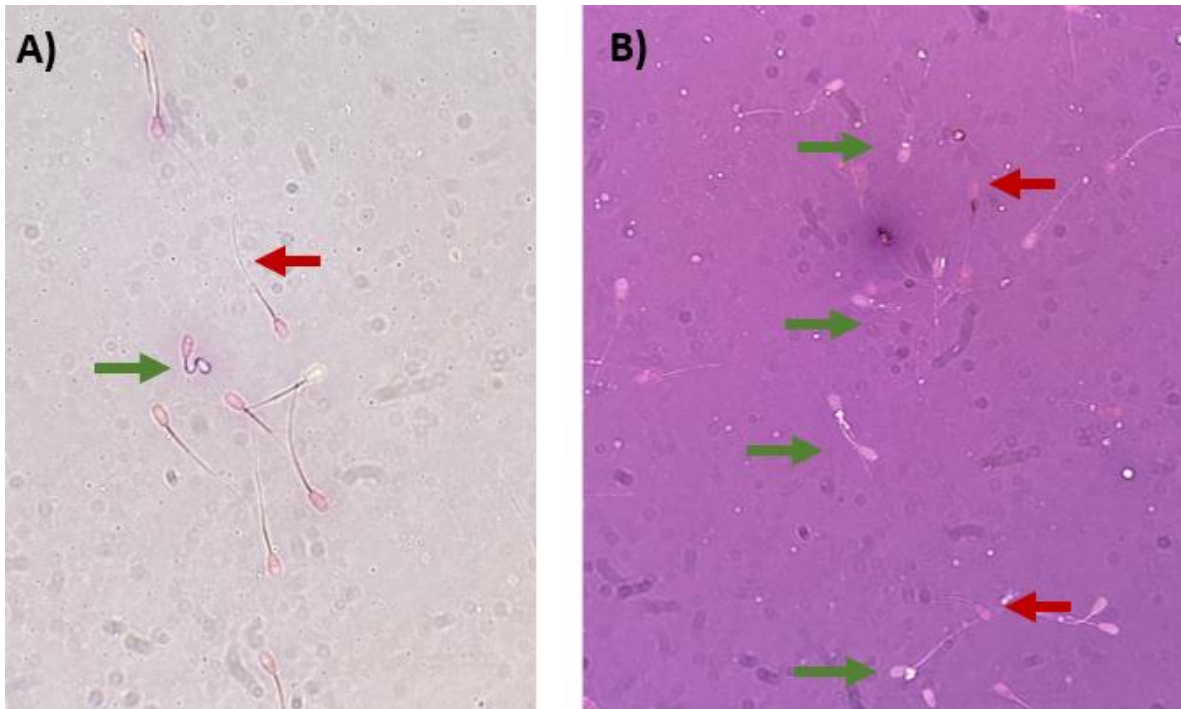


Figura 6. Evaluación espermática bovina de toro Angus, e señalaron con flechas verdes los espermatozoide viables y con rojo los no viables para cada prueba. **A)** Test hiposmótico ; **B)** Test de eosina-nigrosina.

6.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Después de 18 horas post fertilización, los presuntos cigotos se evaluaron en el estereomicroscopio en campo oscuro y se les retiraron por pipeteo mecánico las células de la granulosa. En este punto se pudieron observar algunos cigotos ya clivados con al menos 2 blastómeras, lo que indica una correcta capacidad fertilizante del espermatozoide utilizado.

Los presuntos cigotos desnudados se lavaron en gotas de medio CIV que consistía en un medio de Fluido Oviductal sintético (SOF) suplementado con 5% de SBF, 5 mg/ml de BSA, 0.2 mM de piruvato y 1X de antibiótico. En gotas de 70 μ l de medio CIV fueron sembrados entre 10-12 cigotos. Se les realizó un recambio de 40 μ l de medio CIV a cada gota el día 3 y día 6 post inseminación (pi) por el método de disparo. En el día 3 pi se observó clivaje y se descartaron aquellos embriones que tuvieron un clivaje menor a 4 células o aquellos apoptóticos. El día 7y 8 pi se evaluó el estadio de desarrollo embrionario y se calcularon las tasas de blastocisto.

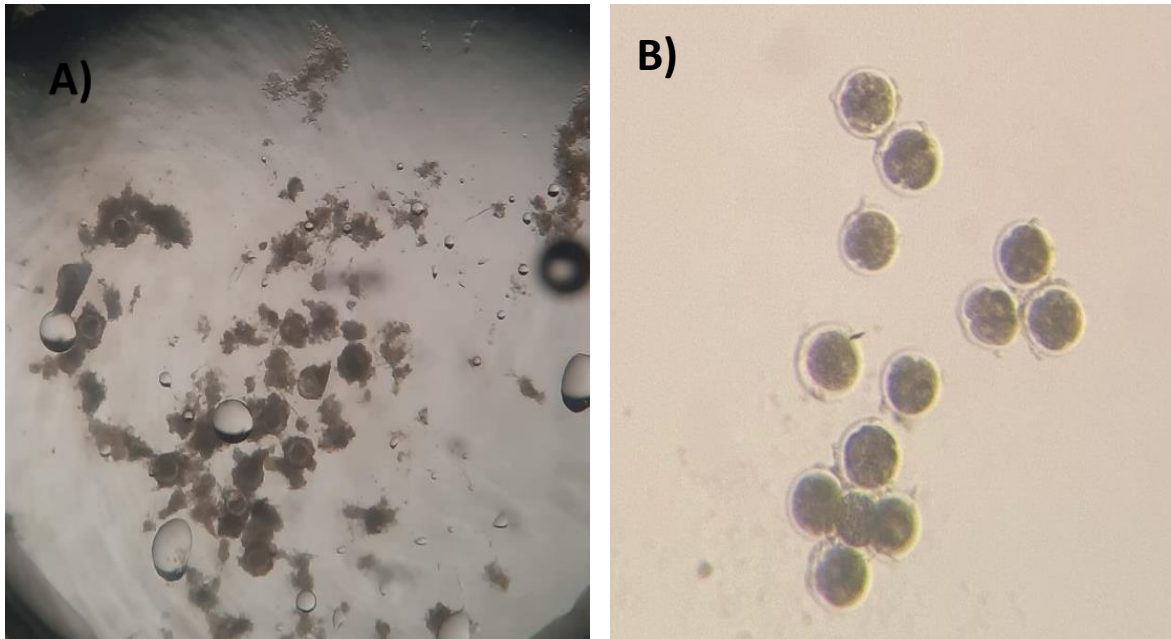


Figura 7. Imagen de presuntos cigotos bovinos. **A)** en el día 1 pi antes de desnudarlos. **B)** embriones bovinos en el día 3 pi correctamente desnudados.

6.6 Técnicas moleculares

Se complementó la PIV de embriones bovinos con el aprendizaje en técnicas moleculares. Se realizaron electroforesis y PCR como herramientas en diagnóstico reproductivo, tinción y fijación de embriones bovinos, como herramientas en la evaluación de embrionaria y se realizó extracción de RNA de semen de toro utilizando $100 \mu\text{l}$ del contenido de una pajilla. Adicionalmente, se realizaron tinciones de Hoechst para ovocitos y embriones bovinos (figura 8). Las tinciones de ovocitos se realizaron con el fin de evaluar el estadio meiótico (Rios & Buschiazzo, 2022). Por otra parte, las tinciones en embriones se realizaron para determinar la celularidad, la cual es considerada una característica de calidad embrionaria. El resultado de las tinciones se observó en un microscopio de fluorescencia con la ayuda de un profesional capacitado para el correcto uso del equipo. Finalmente, para afianzar el conocimiento se apoyó a los docentes en la realización de prácticas de laboratorio a estudiantes de Biología, Ingeniería Biomédica y Medicina Veterinaria y Zootecnia.

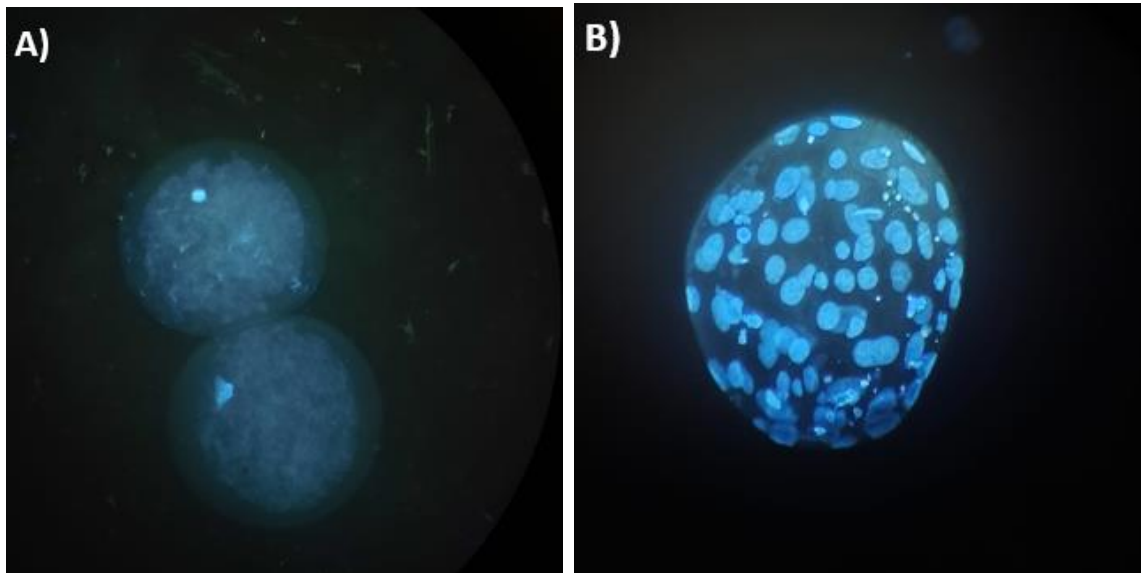


Figura 8. Evaluación nuclear con tinción de Hoechst. **A)** Ovocitos bovinos; **B)** Embrión bovino.

6.7 Journal Club y Academic Coffee break

Complementariamente, se contaron con espacios que permitieron la socialización de artículos de investigación internacionales, relacionados con tecnologías reproductivas y trabajos investigativos de tutores y compañeros de laboratorio en un Journal Club y Coffe break. Con el objetivo de estar contextualizados con los avances en las TRA y su implementación en el sector médico, biomédico, veterinario, ganadero y en planes de conservación de especies en declive y así conocer el alcance de estas biotecnologías, en los Journal Club se expusieron y debatieron temas de actualidad con expertos sobre CRISPR cas, epigenética del envejecimiento y de la obesidad, la PIV de embriones en felinos y bovinos, entre otros. En los Academic Coffee break se generaron retroalimentaciones sobre los procesos realizados cada semana y se debatieron artículos sobre la PIV de embriones bovinos para implementar las recomendaciones y que estas se vieran reflejadas en los resultados de la semana siguiente.

6.8 Embriones bovinos

Después de la fertilización hay una rassa de división celular, formando células llamadas blastómeras, que no involucran un cambio en el tamaño del embrión. Sin embargo, están pasando sucesos importantes como la diferenciación celular entre dos líneas celulares: masa celular interna (MCI) y trofoblasto (TE) que se forman a partir de la compactación de estas blastómeras, suceso que en mamíferos se lleva a cabo, cuando el embrión se ha segmentado en 8 células (Gilbert, 2005). La diferenciación celular comienza en murinos, humanos y ovinos desde la primera división y en bovinos en el estadio de mórula compacta (tabla 2), donde la MCI se ubica internamente y dará origen al embrión y a su saco vitelino, y la TE que se encuentran en la periferia, por otra parte, formará una parte de la placenta

llamada el corión, esta diferenciación es la primera distinción celular del desarrollo de mamíferos. Entre los días 5 y 6 de desarrollo las TE ingresan agua osmóticamente por medio de las bombas sodio potasio, generando una cavidad interna llamada blastocele; fenómeno conocido como cavitación que da lugar al blastocisto (Gilbert, 2005). El embrión continuará con la expansión y eclosión antes de la implantación que determinarán otros estadios explicados en la tabla 2.

Durante la ejecución de la pasantía se llevó un seguimiento de los resultados de la PIV de embriones bovinos (tabla 3) y se diligenció un documento donde se evidenciaban los resultados. En el día 3 pi se cuantificaron las mórulas, retirando las no clivadas y aquellos con menos de 4 células. Posteriormente en los días 7 pi y 8 pi se evaluaba tasas de blastocistos en diferentes estadios: Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto eclosionando (Bh) y Blastocisto eclosionado (Be). Se cuantificó el número de ovocitos cultivados, presuntos cigotos clivados desde una blastómera hasta cuatro, clivados de más de cuatro blastómeras y finalmente se cuantificó la tasa de los embriones obtenidos (Tabla 3 y Anexo 1). Se observaron lo siguientes estadios embrionarios:

Fase del desarrollo	Características
M	Embrión con segmentación de 16-32 células, lo que le otorga el aspecto de una mora, no hay diferenciación de células.
Mc	Aproximadamente 32-64 células. Las blastómeras se unen formando una masa, no se diferencian las divisiones y ocupan el 60% del espacio peri vitelino.
Bi	Zona pelúcida (zp) gruesa, la Zp es la capa que permite únicamente a un espermatozoide pasar. Comienza la formación del blastocele, pero no cavitado, se puede observar diferenciación entre el TE y la MCI.
Bl	Blastocisto cavitado, ocupando el 50% aproximadamente del espacio embrionario, zp gruesa, observación de las dos líneas celulares MCI y el TE.
Bx	Zp delgada y el diámetro del blastocisto aumenta hasta en un 150%. Alta diferenciación de la MCI y el TE. Blastocele con un tamaño superior al 70% del espacio embrionario.
Bh	El TE saliendo de la Zp
Be	Blastocisto desprendido completamente de la Zp.

Tabla 2. Características de las diferentes fases de desarrollo de los embriones (Balaban *et al.*, 2006; Martínez, 2009).

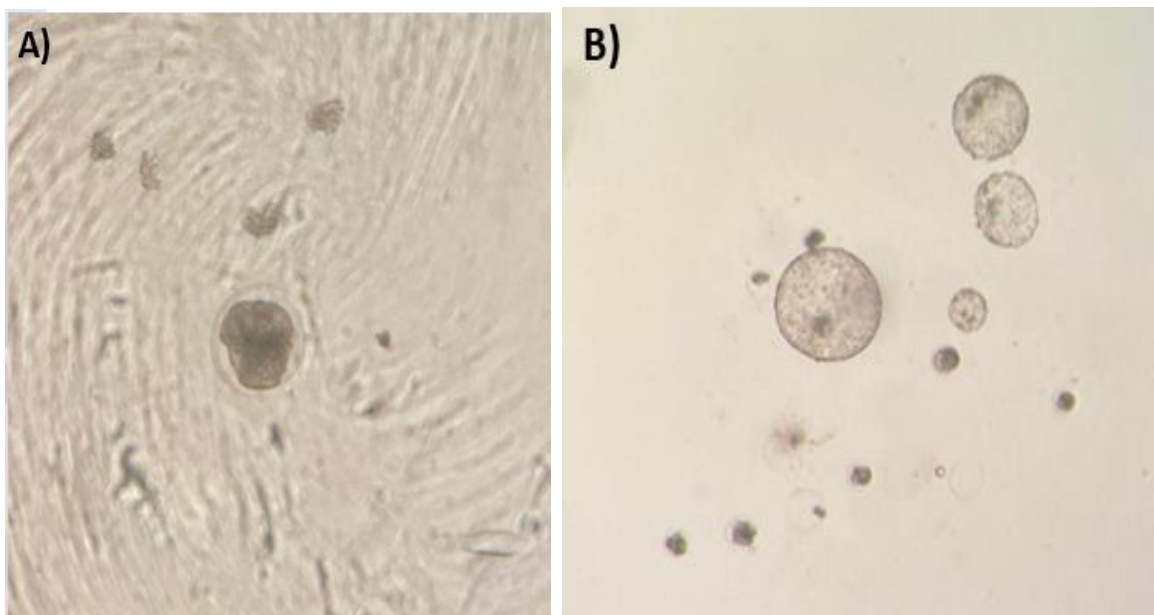


Figura 9. Imagen de embriones bovinos. **A)** presunto cigoto bovino con dos blastómeras, evaluado en día 3 pi; **B)** embriones bovinos evaluados el día 8 pi.

Semana	Días	Toro	Total de ovocitos	Clivados	Porcentaje Clivados	más de 4 células	Porcentaje de más de 4 células	Total embriones	Porcentaje embriones
1	8 Feb-11 Feb	Severa	25	19	76,00%	15	78,90%	5	33,30%
2	15 Feb-19 Feb	Severa	16	4	25%	2	50,00%	0	0%
3	22 Marz- 26 Mar	Severa	24	8	33,30%	5	63%	2	40%
4	28 Marz-02 Abr	Severa	28	9	32,10%	6	66,60%	0	0%
5	04 Abr-08 Abr	Severa	30	25	83,33%	19	76%	11	57,80%
6	02 May -06 May	Severa	39	20	51,20%	9	45%	0	0%
7	25 Abr -30 Abr	Severa	23	16	69,50%	15	93,70%	13	56,40%
		TOTAL	185	101	52,92%	71	67,53%	31	26,79%

Semana	Días	Toro	Total de ovocitos	Clivados	Porcentaje Clivados	más de 4 células	Porcentaje de más de 4 células	Total embriones	Porcentaje embriones
12	25 Abr -30 Abr	Bros	23	16	69,50%	15	93,70%	13	56,40%
		TOTAL	23	16	69,50%	15	93,70%	13	56,40%

Semana	Días	Toro	Total de ovocitos	Clivados	Porcentaje Clivados	más de 4 células	Porcentaje de más de 4 células	Total embriones	Porcentaje embriones
3	21 Feb- 26 Feb	Angus	22	8	36,30%	4	50,00%	0	0%
4	28 Feb-04 Marz	Angus	16	14	87,50%	9	64,20%	0	0%
5	07 Mar-11 Marz	Angus	17	10	58,80%	8	80%	4	50%
6	14 Mar-19 Marz	Angus	38	18	47%	10	66%	0	0%
		TOTAL	93	50	57,49%	31	65,05%	4	13%

Tabla 3. Tabla de resultados de los procesos realizados cada semana durante el desarrollo de la pasantía con porcentaje total de cigotos clivados y de embriones obtenidos separado por toro.

6.9 Creación de material didáctico

Se elaboraron los protocolos de preparación de medios y procedimiento para MIV, FIV Y CIV, con los pasos descritos clara y detalladamente que se siguieron en el laboratorio de biotecnología en salud de la Universidad CES para la PIV de embriones bovinos (Anexo 2 y anexo 3). De manera complementaria se elaboraron dos revisiones, sobre ovogénesis y foliculogénesis (Anexo 4) y sobre la información de los ovocitos de mamíferos (Anexo 5) documentos donde se recopila información sobre temas relacionados con la PIV que servirán de apoyo para la rotaciones de diferentes carreras.

7. Conclusiones

En el transcurso de esta pasantía se aprendieron los protocolos de la producción *in vitro* de embriones bovinos teniendo un 32.06% promedio de embriones totales utilizando 3 razas diferente de toros. Se redactaron protocolos de manera ordenada de los procedimientos de MIV, FIV y CIV junto con el protocolo de preparación del laboratorio lo cuales fueron importantes para mantener un ambiente y un tiempo óptimo para la ejecución del proceso. Estos protocolos, al igual que el material didáctico de las revisiones sobre temas relacionados con la PIVE, se implementaron durante la pasantía y permitieron una mejor comprensión del proceso, concluyendo que es fundamental para el proceso prepararse en temas relacionados con la biología del desarrollo. Se profundizó en métodos para evaluar la calidad embrionaria con tinciones Hoechst, al igual que en la correcta clasificación de los complejos *cúmulos-ovocito* determinantes en la eficacia del proceso. La vitalidad espermática se evaluó mediante tinciones eosina-nigrosina y test HOST, pruebas cruciales para asegurar un buen desarrollo del proceso. Los resultados de la pasantía fueron reclutados en una hoja de seguimiento encontrada en los anexos del documento

Se concluye resaltando la importancia de espacios formativos, como el brindado para la realización de la pasantía, para la capacitación de personal sobre las TRA y así lograr ampliar la visión de los avances biotecnológicos y como estos pueden ayudar en problemáticas actuales, como aumentar la variabilidad genética en poblaciones silvestres *disminuidas ex situ o in situ*, extrapolar información para la PIVE de otras especies en poblaciones en delive, en los hatos ganaderos aumentando la disponibilidad de alimentos y en los humanos con programas de reproducción asistida.

8. Recomendaciones:

Se recomienda que los estudiantes interesados en hacer esta pasantía no matriculen otras asignaturas en las jornadas del mañana puesto a que esta pasantía requiere mucho tiempo y esfuerzo. El trabajo se realiza en las horas de la mañana de lunes a sábado y lo ideal es que el estudiante pueda aprender al máximo todo el proceso de práctica.

9. Anexos

Anexo 1.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/16upCd1GJEylcx5NOrUN1QSEEVVZ5g5yn/edit#gid=1888090434>

Anexo 2.

<https://docs.google.com/document/d/10JCiln8zQoAFj4QC4rXhsHan-40PVj3H/edit>

Anexo 3.

<https://docs.google.com/document/d/13kgJw8HDFSaxiU7uTXmVUT-U-e2bBujA/edit>

Anexo 4.

https://drive.google.com/file/d/1B9BUF64NQBcmBoPdWDzfzVIXN_XpmJ1L/view?usp=sharing

Anexo 5. https://drive.google.com/file/d/1jQUUhiji66ZDoTFfR06K8dN_gb-UnW-_/_view?usp=sharing

10. Bibliografía

Aquilla orellana VA. "EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS SWIM UP Y GRADIENTES DE DENSIDADES PARA LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN LA CLÍNICA BioGEPa." [Internet]. Edu.ec. 2011 [cited 2022 Oct 24]. Available from:

<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2439/1/tq1079.pdf>

Báez Contreras FJ, Landinez Aponte JA, Hernández Fonseca HJ, Villamediana Monreal PC. Evaluación del desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* obtenidos a partir de hembras mestizas. Rev Fac Agron [Internet]. 2010 [cited 2022 Sep 8];27(3):460–78. Available from:

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3660419>

Balaban B, Yakin K, Urman B. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. Fertil Steril [Internet]. 2006 [cited 2022 Oct 18];85(3):559–63. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0015028205039798?token=A74F7B2C1088E9195041EFB551678105C08B88B20933C3F29BD94A4D242545C3DB391565415CAD6E23D7E1F7EDFE7855&originRegion=us-east-1&originCreation=20221018051137>

Bedoya Echeverry NA, Vásquez Araque N, Rivera Rey M, Correa Londoño G, Trujillo Aramburo LE. Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (host). 2003 [cited 2022 Oct 18]; Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/36838>

Betancur Restrepo M. Evaluación de isoespintanol y sericina como suplementos en los medios para la producción *in vitro* de embriones bovinos. Universidad Nacional de Colombia; 2022.

Benham HM. INVESTIGATION OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES (ART) FOR CONSERVATION OF BOVIDAE [Internet]. Mountainscholar.org. 2022 [cited 2022 Oct 21].

Available from:

https://mountainscholar.org/bitstream/handle/10217/235265/Benham_colostate_0053A_17017.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Bonilla León L, Bonilla Trujillo D, Gómez Domínguez RG. Producción de embriones bovinos del laboratorio *in vitro* Colombia durante el año 2019. Vol. 5. Universidad Nacional Abierta y a Distancia; [Internet]. 2019 [citado el 7 de septiembre de 2022] p. 6–16.

Burrola-Barraza ME, González-Rodríguez E. Efectos de los RNAm maternos sobre la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario temprano en mamíferos: Revisión. Rev Mex Cienc Pecu [Internet]. 2015 [citado el 7 de septiembre de 2022];6(1):39–68.

Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242015000100004

Casillas MF. Maduración, fertilización y desarrollo embrionario después de la vitrificación de ovocitos inmaduros porcinos *in vitro*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA. 2014 [Internet]. Archive.org. [cited 2022 Sep 7]. Available from:

<https://scholar.archive.org/work/zijkbg3aqjc6nfzhw2xmu5xlpa/access/wayback/http://bi.ndani.izt.uam.mx/downloads/73666461g>

Díaz AM, Bustos JE, Bernal SM, Jaramillo. Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro* [Internet]. Edu.co. 2013 [cited 2022 Oct 18]. Available from:

<https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/3484/ART.%2094.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Espejo M, Alejandro D. Estado actual, proyecciones y perspectivas de la *fertilización in vitro* (FIV) en la ganadería bovina en Colombia. 2018 [cited 2022 Sep 8]; Available from:

<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/21321>

Estrella, C.A., Suconota, A.G. *, Ayala, L.E. Vista de Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes [Internet]. 2017.Edu.ec.

[citado el 7 de mayo de 2022]. Disponible en:

<https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1499/1184>

Ferré L, Ross P, Ortega H, Asociado P, Bartolomé J, Miragaya M. Nuevas estrategias para mejorar la eficiencia del semen sexado en producción *in vitro* de embriones bovinos.

[Internet]. Edu.ar:8443. 2017 [cited 2022 Oct 21]. Available from:

<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1023/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].

2014;111(11):4139–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1321569111>

Gallegos F, Mancheno A, Mena L, Murillo A. Bovine *in vitro* Embryo Production: State of the Art. *epoch* [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 21];172–85. Available from: <https://knepublishing.com/index.php/epoch/article/view/11192>

Gilbert. *Biología del desarrollo - 7b: Edición*. Editorial Medica Panamericana; 2005.

Gonella Díaz ÁM, Atuesta Bustos JE, Bernal Ulloa SM, Chacón Jaramillo L. Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. *Rev Investig Agrar Ambient* [Internet]. 2013 [cited 2022 Oct 24];4(1):65. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285691>

Leidenfrost S, Boelhauve M, Reichenbach M, Güngör T, Reichenbach H-D, Sinowatz F. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(7):e22121. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022121>

Marei WF, Ghafari F, Fouladi-Nashta AA. Papel del ácido hialurónico en la maduración y posterior desarrollo embrionario temprano de ovocitos bovinos [Internet].

Martínez LC. Fisiología de la reproducción bovina: desde la fecundación hasta la implantación embrionaria [Internet]. *Edu.co*. 2009 [cited 2022 Oct 18]. Available from: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1312&context=medicina_veterinaria

Sciencedirect. 2012. [cited 2022 Oct 16]. Available from: <https://sciencedirect.cesproxy.elogim.com/science/article/abs/pii/S0093691X12001847?via%3Dihub>

Marcel A, Morales T, Camilo J, Balvín Á, Victoria J, Jaramillo B. Tinciones utilizadas en oocitos y embriones bovinos [Internet]. *Edu.co*. [cited 2022 Sep 8]. Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/download/326469/20783743/>

Montes J, Torres M, Rugeles C, Almanza R, Guimarães J. INDUCCIÓN *IN VITRO* DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA CON HEPARINA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS BRAHMAN Y GYR [Internet]. *Scielo*. 2012 [cited 2022 Oct 21]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000200021

Páez-Barón EM, Corredor-Camargo ES. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro [Internet]. *Unirioja*. 2014. [cited 2022 Oct 24]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/download/articulo/5178282.pdf>

Quispe CE, Ancco G. E, Solano A. J, Unchupaico P. I, Mellisho S. E. Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Rev Investig Vet Peru* [Internet]. 2018 [citado el 7 de mayo de

2022];29(4):1114–21. Disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172018000400004&script=sci_arttext

Ramírez Orozco JA. Formación en producción *in vitro* de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia. 2020 [citado el 7 de mayo de 2022]; Disponible en:

<https://repository.ces.edu.co/handle/10946/5135>

Ríos GL, Buschiazzi J, Mucci NC, Káiser GG, Cesari U, Alberio R. Factor de crecimiento epidérmico combinado y suplementos de ácido hialurónico del medio de maduración *in vitro* y su impacto en el proteoma y la competencia del ovocito bovino [Internet].

PubMedCentral. 2014. [cited 2022 Oct 16]. Available from:

<https://sciedirect.cesproxy.elogim.com/science/article/abs/pii/S0093691X14006402?via%3Dihub>

Ríos G, Buschiazzi J. ¿Por qué y para qué producir embriones bovinos *in vitro*? [Internet]. Gob.ar. 2022 [cited 2022 Oct 21]. Available from:

https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/12994/INTA_CRBsAsSurEEABalcarce_Rios_G_Producir_embryones_bovinos.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Salgado O R, Vergara G O, Ramírez P L. Efecto de gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de oocitos bovinos cultivados *in vitro*. Rev MVZ Córdoba [Internet]. 2010 [cited 2022 Oct 21];15(1):1954–60. Available from:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682010000100008

Salgado O. R, Simanca S. J, Vergara G.O. Efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados *In vitro* [Internet]. Redalyc.org. 2013 [cited 2022 Oct 21]. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95926991004.pdf>

Sánchez R. A, Zamora D. P. Efecto del Medio Hipoosmótico sobre la Vitalidad Espermática en Semen Canino. Rev Investig Vet Perú [Internet]. 2016 [cited 2022 Oct 17];27(2):288.

Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172016000200010

Torres J, Lesobre L, Boullenger S, Chalah T, Lacroix F, Yves Hingrat. Assisted reproduction techniques to improve reproduction in a non-model species: The case of the Arabian bustard (*Ardeotis arabs*) conservation breeding program. Animals (Basel) [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 21];12(7):851. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/7/851/htm>

Turathum B, Gao E-M, Chian R-C. La función de las células del cúmulo en el crecimiento y la maduración de los ovocitos y en la ovulación y fecundación subsiguientes [Internet].

2021. PubMedCentral. [cited 2022 Oct 16]. Available from:

<https://ncbi.cesproxy.elogim.com/pmc/articles/PMC8470117/>

Thongphakdee A, Sukparangsib W, Comizzolic P, Chatdarongd K. Reproductive biology and biotechnologies in wild felids [Internet]. ScienceDirect. 2020 [cited 2022 Oct 16].

Available from:

<https://sciedirect.cesproxy.elogim.com/science/article/pii/S0093691X2030100X>

Trujillo Jiménez KV, León LB. Técnicas *in vitro* de valoración espermática aplicadas en bovinos [Internet]. Edu.co. 2021 [cited 2022 Oct 17]. Available from:

http://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/34785/1/2021_tecnicas_vitro_valoracion.pdf

Urzi O, Bagge RO, Crescitelli R. The dark side of foetal bovine serum in extracellular vesicle studies. J Extracell Vesicles [Internet]. 2022;11(10):e12271. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1002/jev2.12271>

Vásquez NA, Torres V, Rojano BA. Efecto del ácido ascórbico durante maduración *in vitro* de oocitos bovinos en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y competencia para el desarrollo embrionario. CIT Inform Tecnol [Internet]. 2014 [citado el 7 de septiembre de 2022];25(2):141–50. Disponible en:

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642014000200016

Velez IC, Universidad Nacional de Colombia, Chica A, Urrego R, Torres V, Jimenez-Escobar C. Producción *in vitro* de embriones a partir de complejos cúmulos oocitos tipo II en bovinos *Bos indicus*. CES Med Vet Zootec [Internet]. 2017 [cited 2022 Oct 16];12(2):76–87.

Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072017000200076