

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS DE GRADO

**EVALUACIÓN DEL FLUIDO UTERINO DE LLAMA (*Lama glama*) EN EL
DESARROLLO EMBRIONARIO DE GANADO BOVINO PARA CULTIVOS *IN VITRO***

**PRESENTADO POR:
Marisabel Nina Vera**

LA PAZ-BOLIVIA

2021

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DEL FLUIDO UTERINO DE LLAMA (*Lama glama*) EN EL
DESARROLLO EMBRIONARIO DE GANADO BOVINO PARA CULTIVOS *IN VITRO*

Tesis de grado presentado como requisito parcial
Para optar el Título de Licenciatura en
Medicina Veterinaria y zootecnia

Marisabel Nina Vera

Asesores:

M.V.Z.Ph.D. Celso Ayala Vargas

Ing. Reynaldo Susaño Mamani

Tribunal Examinador:

Ing. M.Sc. Rubén Tallacagua Terrazas

Ing. M.Sc. Daniel Severo Choque

Ing. Eloy Hernán Huacani Rivera

APROBADO

Presidente del tribunal examinador:

La Paz- Bolivia, 2021

DEDICATORIA

A DIOS

Por estar siempre en todos los pasos que atravieso día a día, por guiarme y protegerme, por enviarme personas valiosas a mi vida.

A MIS PADRES

Dedico esta tesis a mis padres Hugo y Elizabeth; siendo el pilar fundamental en mi vida, siempre apoyándome incondicionalmente en lo económico, también fueron los que me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos, muchos de estos logros se los debo a ustedes queridos padres.

A MI ABUELA

Por todo tu cariño, consejos que recibí en cuanto te encontrabas viva querida abuelita ahora que estas en el cielo serás mi ángel, cuidándome y recibiendo siempre tus bendiciones.

A MI FAMILIA

A mi familia en general que se encuentran en el extranjero a pesar de lo lejos me mandaron ánimos para cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a Dios por concebirme mis deseos en cada paso que llevo a lo largo de esta vida, también dar gracias a mis padres por siempre estar al tanto, apoyándome en las decisiones que proyecto.

Al Ing. Juan Rueda Director Regional UAC- Batallas por permitirme elaborar mi tesis en el laboratorio de reproducción animal y por sus gratos consejos que quedaron en mi mente.

Al asesor M.V.Z. Ph.D. Celso Ayala quien estuvo al pendiente de la investigación en base de lo que se avanzaba y por guiarme en el desarrollo de mi tesis.

Al Ing. Reynaldo Susaño asesor y amigo, gracias a ti logre realizar mi investigación, siempre guiándome en todo el proceso. Los resultados desde un inicio fue ostentoso mejor de lo que esperaba y una gran parte del desarrollo de este excelente trabajo se lo debo a usted.

A la Dra. Gisela Rojas quien se convirtió en una amiga, donde siempre me colabore y aconsejo a inicios del proceso de mi proyecto.

Al Ing.M.Sc. Rubén Tallacagua, Ing.M.Sc. Daniel Severo y Ing. Eloy Huacani miembros del jurado, quienes fueron capaces de sacarse un poco de su tiempo para realizar la corrección del proceso de elaboración de tesis, gracias por su paciencia.

Al Matadero Municipal de “Los Andes” El Alto por haberme permitido ingresar a sus instalaciones para la toma de muestras de ovarios de vacas faeneadas.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

B	=	Blastocisto
Bt	=	Blastocisto Temprano
Bx	=	Blastocisto Expandido
CEOB	=	Células del epitelio oviductal bovino
COCs	=	Complejo cúmulus oophorus
FIV	=	Fertilización <i>in vitro</i>
FO	=	Fluido Oviductal
FU	=	Fluido Uterino
FUB	=	Fluido Uterino Bovino
FOB	=	Fluido Oviductal Bovino
GnRH	=	Hormona liberadora de gonadotropina humana
KSOMaa	=	Medio optimizado simple de potasio
Mo	=	Mórula
Mo _c	=	Mórula Compacta
OPU	=	(<i>ovum pick-up</i>) Aspiración folicular guiada por ultrasonido
PIVE	=	Producción <i>in vitro</i> de Embriones
SOF	=	Fluido ovíductal sintético
ZP	=	Zona Pelúcida
g	=	Gramos
Mm	=	Milimolar
μL	=	Microlitros
ug	=	Microgramo
ml	=	Mililitros
UI	=	Unidad Internacional
cm	=	Centímetro

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	I
CONTENIDO.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VI
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	VI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	3
1.2. Justificación	5
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo General.....	6
2.2. Objetivo Específicos	6
2.3. Hipótesis.....	6
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina y camélida.....	7
3.1.1. Ovarios.....	7
3.1.2. Oviductos	7
3.1.3. Útero	8
3.1.4. Cuello uterino o cérvix.....	8
3.1.5. Vagina.....	9
3.1.6. Vestíbulo vaginal.....	9
3.1.7. Vulva	9
3.2. Diferencias reproductivas en el ganado bovino y camélido	10
3.3. Ovogénesis.....	11
3.4. Foliculogénesis.....	12

3.4.1. Folículos primordiales	12
3.4.2. Folículos secundarios	13
3.4.3. Folículo terciario o antral.....	13
3.5. Espermatogénesis	13
3.6. Producción del fluido oviductal durante el ciclo sexual	14
3.7. Composición del fluido oviductal y uterino en fase periovulatoria.....	15
3.8. Composición del fluido oviductal y uterino en el desarrollo embrionario.....	16
3.9. Producción <i>in vitro</i> de embriones.....	20
3.9.1. Obtención de los complejos Cumulus-Ovocitos (Cocs)	20
3.9.2. Maduración de ovocitos <i>in vitro</i>	22
3.9.3. Fecundación <i>in vitro</i>	23
3.9.4. Cultivo de los embriones <i>in vitro</i>	25
3.10. Desarrollo embrionario	27
3.10.1. Primeras Divisiones del Cigoto	27
3.10.2. Evaluación de la calidad embrionaria.....	30
4. MATERIALES Y METODOS.....	32
4.1. Localización.....	32
4.2. Materiales	33
4.2.1. Material biológico	33
4.2.2. Material genético.....	33
4.2.3. Equipo de laboratorio	33
4.2.4. Materiales de laboratorio.....	33
4.2.5. Materiales para la colecta del fluido uterino de camélido.....	34
4.2.6. Materiales para la colecta de ovarios.....	34
4.2.7. Medios para la Producción de Embriones <i>in vitro</i>	35
4.2.8. Hormonas.....	35
4.2.9. Otros	35
4.2.10. Material de gabinete.....	35
4.3. Metodología.....	36
4.3.1. Procedimiento pre experimental.....	36
4.3.2. Procedimiento experimental para la obtención del fluido uterino del camélido	37
4.3.3. Colecta de ovarios en matadero	42

4.3.4. Recuperación de ovocitos	43
4.3.5. Método de maduración de ovocitos <i>in vitro</i>	45
4.3.6. Fertilización de ovocitos <i>in vitro</i>	47
4.3.7. Medio de cultivo <i>in vitro</i>	49
4.3.8. Evaluación del desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	51
4.4. Análisis estadístico	53
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	54
6. CONCLUSIONES	64
7. RECOMENDACIONES	65
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	66
ANEXOS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Anatomía Reproductiva del Ganado Bovino a) y Camélido b).....	10
FIGURA 2. Clasificación morfológica de los folículos ováricos.....	13
FIGURA 3. Desarrollo embrionario temprano en el bovino <i>in- vivo</i>	28
FIGURA 4. Porcentaje de la Maduración de ovocitos <i>in vitro</i>	56
FIGURA 5. Porcentaje del desarrollo embrionario cultivado a las 48 horas.....	57
FIGURA 6. Porcentaje del clivaje para la producción de embriones <i>in vitro</i> cultivados al día 8.....	58
FIGURA 7. Clasificación sobre la calidad de embriones bovinos según (IEST).....	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Cantidad del fluido oviductal bovino representado en ml por 24 horas, en fase de estro y fase luteal.....	14
TABLA 2. Diferencia en la composición del oviducto y útero.....	17
TABLA 1: Clasificación de los COCs.....	22
TABLA 3. Estados del desarrollo embrionario bovino <i>in-vitro</i>	30
TABLA 4: Clasificación y caracterización morfológica del embrión bovino según su calidad.....	31
TABLA 5. Estadios del desarrollo embrionario de la especie bovina.....	51
TABLA 6. Porcentaje de la maduración de ovocitos <i>in vitro</i> de bovino para medios de cultivo convencional +fluido uterino.....	54
TABLA 7. Porcentaje del desarrollo embrionario <i>in vitro</i> bovino cultivados a las 48hrs, con el medio de cultivo convencional + la adición del fluido uterino de camélido.....	55
TABLA 8. Porcentajes de clivaje para la producción de embriones <i>in vitro</i> bovino cultivados al día 8, mediante la adición del fluido uterino de camélido al medio de cultivo.....	57
TABLA 9. Clasificación de los embriones de bovinos producidos <i>in vitro</i> según IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones).....	61

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Ubicación del centro de Mejoramiento Genético del Altiplano–UAC BATALLAS.....	32
---	----

ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1. Camélidos en pastoreo.....	36
IMAGEN 2. Hormona liberadora de gonadotropina (GNRH).....	38
IMAGEN 3. Inspección de la vulva.....	38
IMAGEN 4. Tranquilizante (Acepromacina).....	39
IMAGEN 5. Sujeción a la Llama.....	40
IMAGEN 6. Introducción de la Sonda Foley Nº18.....	41
IMAGEN 7. Colecta de fluido uterino del camélido.....	41
IMAGEN 8. Procesamiento del fluido uterino de camélido en laboratorio.....	42
IMAGEN 9. Muestra de fluido uterino de camélido en la conservadora.....	42
IMAGEN 10. Colecta de ovarios en planta de faeno.....	43
IMAGEN 11. Toma de temperatura de la muestra en laboratorio.....	44
IMAGEN 12. Retiro de detritus del ovario.....	44
IMAGEN 13. Aspiración folicular.....	45
IMAGEN 14. Expansión del Cumulus ophorus (CoCs).....	47
IMAGEN 15. Incorporación del semen al medio SEMEN-PREP.....	48
IMAGEN 16. Visto por microscopio 10x: Día 3 (4-8 células).....	50
IMAGEN 17. Visto por microscopio 10x: Día 8 (16-32 células-Morula y Blastocisto).....	50
IMAGEN 18. Desarrollo embrionario temprano del bovino <i>in vitro</i>	52
IMAGEN 19: Blastocisto expandido (Bx).....	58
IMAGEN 20: Blastocisto temprano (Bt) Blastocisto expandido (Bx).....	58
IMAGEN 21. Blastocisto expandido grado 1 para el medio de cultivo + Fluido uterino.....	62

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Proteínas más abundantes del fluido oviductal de la especie bovina (FOB).....	88
ANEXO 2: Proteínas más abundantes de fluido uterino de la especie bovina (FUB).....	89
ANEXO 3. Limpieza profunda de laboratorio.....	89
ANEXO 4. Equipos y materiales de laboratorio.....	90
ANEXO 5. Materiales para la colecta del fluido uterino de Llama.....	90
ANEXO 6. Construcción de la tarima.....	91
ANEXO 7. Camélido transportado al brete de bovino (adaptado).....	91
ANEXO 8. Extracción del tranquilizante (Acepromacina) 1ml.....	92
ANEXO 9. Procesamiento del fluido uterino de Llama.....	92
ANEXO 10. Toma de muestra de ovarios en predios del matadero Los Andes-El Alto....	93
ANEXO 11. Extracción, lavado y secado del ovario (Libre de impurezas).....	93
ANEXO 12. Aspiración del fluido folicular.....	94
ANEXO 13. Medios de cultivo comercial para la producción de embriones <i>in vitro</i>	94
ANEXO 14. Cambio de medio de cultivo a las 48hrs.....	95
ANEXO 15. Pesaje del efervescente 0,24g.....	95
ANEXO 16. Adaptación de una incubadora convencional.....	96
ANEXO 17. Verificación del Ph en los medios (PIV).....	96
ANEXO 18. Vorterización de cigotos (desnudación del cumulus ophurus).....	97
ANEXO 19. Visto por esteroscopio a 10x: Día 3 (4-8 células).....	97
ANEXO 20. Certificado de trabajo de campo del Matadero Municipal “Los Andes” El-Alto.....	98

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del fluido uterino de Llama (*Lama glama*) en el desarrollo embrionario de ganado bovino para cultivos *in vitro*. Para ello se realizó la obtención del fluido uterino utilizando una Llama de buena conformación corporal, se procedió a atravesar hacia el cuerno uterino con la ayuda de la Sonda Foley Nº 18 llevando a cabo la colecta. La muestra efectuada se depositó en tubos ependorff y trasladado a congelación. Para la producción de embriones *in vitro* se utilizaron 428 ovocitos procedentes de vacas faenadas, fueron usados para conformar dos grupos de estudio el Medio de cultivo convencional y el segundo al Medio de cultivo+ fluido uterino, los ovocitos fueron cultivados en medio de maduración (BO-HEPES) durante 24hrs, posteriormente fueron fertilizados (FER-TALP) por un periodo de 24hrs previamente se realizó la capacitación de los espermatozoides por la técnica *Swin-up*, finalmente los presuntos cigotos fueron cultivados adicionando el fluido uterino 1uL al medio de cultivo (BO-IVC). Todo el proceso fue incubado a 38,5°C, 5% CO₂ de aire y un 95% de humedad relativa. Los resultados fueron los siguientes: a las 48hrs para primer grupo se obtuvo un 31,40% de división embrionaria y para el segundo 36,97% sin encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$). Al día ocho el porcentaje de embriones fue mejor con la adición de fluido uterino logrando el 20,17% con respecto al primero del 14,88% existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$). Por último los embriones fueron clasificados en cuatro categorías según IETS: Para el medio de cultivo convencional se obtuvo 9,9% excelente calidad, 19,83% regular calidad, 24,79% mala calidad, en relación al medio de cultivo suplementado se halló 15,12% excelente calidad, 25,21% regular calidad, 27,73% mala calidad, considerando transferible. La cuarta lo considera intransferible obteniendo un 45,55% para el primer grupo y para el segundo 31,39%. En conclusión la adición del fluido uterino de Llama al medio de cultivo mejoro la tasa de desarrollo embrionario alcanzando hasta el estadio de blastocisto expandido, no existiendo diferencia por medio de la maduración y fertilización *in vitro*, sin embargo la calidad embrionaria en el aspecto morfológico de la división se halló influenciada por la competencia en el medio de cultivo.

Palabras clave: Fluido uterino de Llama, Blastocisto expandido, Fertilización *in vitro*

SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the effect of llama uterine fluid (Lama glama) on the embryonic development of cattle for in vitro cultures. For this purpose, the uterine fluid was obtained using a flame of good body conformation, we proceeded to cross to the uterine horn with the help of the Foley Probe carrying out the collection. The sample was deposited in ependorff tubes and transferred to freezing. For the production of embryos in vitro 428 oocytes from slaughtered cows were used, they were used to form two study groups the conventional culture medium and the second to the culture medium + uterine fluid, the oocytes were cultured in maturation medium (BO-HEPES) for 24hrs, later they were fertilized (FER-TALP) for a period of 24hrs previously the training of sperm was performed by the Swin-up technique , finally the alleged zygotes were cultured by adding the uterine fluid 1uL to the culture medium (BO-IVC). All the process was incubated at 38.5°C.5% CO₂ air and 95% relative humidity. The results were as follows: at 48hrs for the first group, 31.40% of embryonic division was obtained and for the second 36.97% without finding significant differences ($p < 0.05$). At day eight the percentage of embryos was better with the addition of uterine fluid achieving 20.17% with respect to the first of 14.88% there being significant differences ($p > 0.05$). Finally the embryos were classified into four categories according to IETS: For the conventional culture medium was obtained 9.9% excellent quality, 19.83% regular quality, 24.79%, poor quality, in relation to the supplemented culture medium was found 15.12% excellent quality, 25.21% regular quality, 27.73% poor quality, considering transferable. The fourth it considers it non-transferable obtaining 45.55% for the first group and for the second 31.39%. In conclusion, the addition of llama uterine fluid to the culture medium improved the rate of embryonic development reaching the stage of expanded blastocyst, there being no difference through maturation and in vitro fertilization, however the embryonic quality in the morphological aspect of the division was influenced by competition in the culture medium.

Keywords: Uterine Flame Fluid, Expanded Blastocyst, In Vitro Fertilization

1. INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas se han caracterizado por sus grandes avances durante años, en los procedimientos dirigidos a la reproducción asistida en humanos y mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales (Hansen, 2006). Como a la conservación y manejo de la población de fauna silvestre en peligro de extinción (Ptak, *et al.*, 2000; Swanson, 2006).

El uso de estas biotecnologías aplicadas a la reproducción animal es importante en los países en vías de desarrollo donde albergan la mayoría de la población, diversos investigadores pronostican una catástrofe mundial en la producción de alimentos para la humanidad. El empleo de estas técnicas puede implicar un importante progreso biotecnológico en la producción lechera del ganado bovino (Morales Cruz, 2017).

Una técnica de gran valor que dio paso para la aplicación de la inseminación artificial y la transferencia de embriones, es la producción *in vitro* de embriones bovinos, esto ha ido incrementado en estos últimos años a nivel mundial con fines comerciales (Perry, 2014). Aprovechando reproductivamente de hembras sacrificadas de alto valor económico y también produciendo embriones en masa con toros mejorados, los embriones producidos *in vitro* pueden ser criopreservados o bien transferidos a hembras receptoras. Los pasos de esta técnica son: la obtención y maduración de ovocitos, fertilización y el cultivo y desarrollo del embrión (Morales Cruz, 2017).

No obstante el mayor obstáculo en el desarrollo de embriones *in vitro* en varias especies aplicados en las biotecnologías, tales como FIV, ha sido el bloqueo de las divisiones celulares que ocurre en el método de cultivo *in vitro* (Tervit *et al.*, 1972). En el bovino el bloqueo sucede en el estado 8 a 16 células, no permitiendo alcanzar la etapa de blastocisto, es el período en el que se establece el mayor porcentajes de pérdidas del sistema (Enright, *et al.*, 2000; Rizos *et al.*, 2002; Galli *et al.*, 2003; Lonergan, *et al.*, 2003; Lonergan, *et al.*, 2004).

Los blastocistos que llegan hasta esta etapa se consideran de menor calidad de los embriones logrados que los producidos *in vivo*; al ser de menor calidad se considera que el potencial de desarrollo disminuye (Bang *et al.*, 2015).

Para promover la competencia de desarrollo de ovocitos de bovino y la subsecuente calidad de los embriones se ha adicionado al fluido oviductal de vesícula extracelular del istmo (Lopera- vasquez *et al.*,2017) y glucocorticoides (GCs) como también la piridoxina que inhibe la actividad de la catepsina B (CTBS) durante la maduración *in vitro* (IVM) y el cultivo *in vitro* (IVC), los dos anteriores benefician el desarrollo embrionario porque son importantes mediadores de eventos celulares clave, relacionados con la elevación de transcritores embrionarios que participan en el metabolismo de los lípidos y glucosa, así como en la respuesta al estrés celular (Da costa *et al.*,2016).

Al encontrarse los oviductos conjuntamente con el útero, podría generar algunos componentes similares u otros para la división celular del ganado bovino, logrando un adecuado ambiente *in vitro*. Sin embargo el efecto del fluido uterino de Llama no ha sido evaluado aun en el medio de cultivo.

1.1. Antecedentes

En las biotecnologías de la reproducción; La producción *in vitro* junto con el sexado conforman en la tercera generación. Los primeros trabajos de producción *in vitro* de embriones de las especies de intereses zootécnicos se remontan a 1970, cuando Sreenan fecundó ovocitos, maduros *in vitro* con espermatozoides preincubados. Las primeras gestaciones producto de la transferencia de embriones producidos totalmente *in vitro*, fueron recién en 1987 (Xu *et al.*, 1987).

Los embriones de los mamíferos pueden ser cultivados bajo un sin número de condiciones; sin embargo, los resultados en cuanto a la viabilidad de los blastocistos pueden ser extremadamente diferentes (Cordova *et al.*, 2014; Gardner y Lane., 2014; Orsi y Reischl., 2007).

En la Estación Experimental de Chorquenaira Mamani *et al.* (2017a) estudio la fertilización *in vitro* en el ganado bovino en condiciones de altura, considerando dentro de ello a la maduración, fertilización y medio de cultivo *in vitro*. En la maduración adicióno la hormona luteinizante (LH) al líquido folicular, logrando obtener porcentajes favorables, en cuanto en el medio de cultivo los presuntos cigotos se vieron reducidos comparado con otros investigadores.

Susaño *et al.* (2017a) Apreció la viabilidad post-criopreservación de embriones de bovinos producidos *in vitro*. Trabajo con embriones en estado de blastocisto de calidad excelente y regular, obteniendo datos mayores para embriones viables por vitrificados-desvitrificados al contrario de los no viables y perdidos con clasificación pobre y degenerado. Todo esto indica que los embriones de bovinos pueden ser conservados a largos periodos de tiempo por los métodos de congelación convencional y vitrificación.

Los trabajos diseñados para definir las condiciones necesarias para el desarrollo de embriones de bovino en estados tempranos han sido lentos debido a que los ovocitos fecundados *in vivo* son relativamente difíciles de obtener ya que se requieren procedimientos quirúrgicos (Ellington *et al.*, 1990). Además, el bloqueo de la división celular *in vitro* desalentó las investigaciones en un comienzo. Sin embargo, Camous *et al.*(1984) obtuvieron algunos éxitos creando la idea de imitar lo más cercanamente

posible las condiciones presentes en el oviducto y el útero durante los primeros 7 días de desarrollo previo a la implantación” (Feugang *et al.*, 2009); previamente han reportado el uso del fluido oviductal como suplemento en el medio de cultivo: (Nedambale *et al.*, 2004) en la Universidad de Connecticut – EUA ha valorado al sistema único y secuencial del fluido oviductal sintético y al medio optimizado simple de potasio para el cultivo de embriones, consiguiendo incrementar el desarrollo embrionario temprano y promoviendo elevadas tasas de eclosión (Cole y Cupps, 1984). Además observó por microscopia de epifluorescencia que los blastocistos poseían una calidad más elevada al tener un mayor número de células.

Por otro lado Pahuara (2015a) investigo el porcentaje de división embrionaria a las 48 horas post inseminación y el porcentaje de embriones producidos a los siete días de cultivo con el medio optimizado simple de potasio para el primer protocolo y fluido oviductal sintético para el segundo protocolo. Concluye que el fluido oviductal sintético es mejor que el medio optimizado simple de potasio en el desarrollo embrionario hasta blastocisto, sin embargo la calidad se encuentra influenciada por la competencia para el desarrollo y las condiciones subóptimas de cultivo.

Recientemente Arista (2019a) a valorado y comparado la capacidad fecundante en la producción de embriones *in vitro* de dos bovinos homocigotos de la raza Aberdeen Angus. En la investigación trabajo con semen criopreservado y para el medio de cultivo empleo al fluido oviductal sintético. Adquiriendo como resultado porcentaje superiores de embriones para el toro JTRM que para el VTRM, por lo tanto concluye que ambos animales no difieren en la motilidad individual pero si en la producción de embriones.

Soto *et al.* (2019a) Da a conocer el efecto del co-cultivo con células oviductales y del cumulus oophorus sobre el porcentaje de embriones *in vitro*. Registrando una menor cantidad de blastocisto con células del oviducto a diferencia del otro co-cultivo al día 8, finalmente deduce que el uso de medios condicionados con células somáticas puede estimular al desarrollo hasta el estadio blastocisto *in vitro* de los embriones bovinos. Así mismo al utilizar células del epitelio oviductal bovino sostienen el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos superando el bloqueo de las divisiones celulares y permitiéndoles

alcanzar los estados de mórula y blastocisto (Eyestone y First, 1989; Eyestone *et al.*, 1991; Ellington y col., 1990; Hernández-Ledezma *et al.*, 1996).

1.2. Justificación

En Bolivia, en las zonas del altiplano existe poca referencia acerca de la producción *in vitro* de embriones (PIVE) en el ganado bovino, las biotecnologías reproductivas se ven escasas aun en esta área mientras en otros países existen numerosos estudios en la PIV acerca de los medios de cultivo que permiten lograr el desarrollo de los embriones de bovinos *in vitro*, aunque es posible alcanzar los estadios preimplantacionales avanzados, la cantidad y la calidad son un poco satisfactorios, o no todos los cigotos son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto, también es factible encontrar una deficiencia en los medios donde son elaborados para las zonas de menor altitud. Fernández, (1996) En su estudio de fertilización *in vitro* de ovocitos tomo muestras de vacas cebú pos mortem concluye que la mayor dificultad es durante el proceso del cultivo *in vitro*.

En la actualidad este trabajo de investigación pretende contribuir un protocolo eficaz, con la suplementación del fluido uterino de Llama (*Lama glama*) al medio de cultivo sin la necesidad de utilizar otro suplemento de baja disponibilidad, el fluido destaca componentes bioquímicos orgánicos como aminoácidos, proteínas, péptidos, restos celulares y entre otros. Por otra parte al suplementar al medio de cultivo con el fluido uterino será de gran utilidad en producir embriones *in vitro*, además la información recabada en este estudio ayudara a futuros colegas a realizar (PIV) en laboratorio, donde abre un camino para incrementar la eficiencia reproductiva, ampliando así la investigación de la especie bovina en zonas que se encuentran a más de 3800msmm, además sería de gran ayuda para desarrollar embriones *in vitro* de animales que se encuentran en peligro de extinción.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto del fluido uterino de Llama (*Lama glama*) en el desarrollo embrionario de ganado bovino para cultivos *in vitro*.

2.2. Objetivo Específicos

- Determinar el porcentaje del desarrollo embrionario con el medio de cultivo convencional.
- Determinar el porcentaje del clivaje embrionario al día ocho suplementados con el fluido uterino.
- Clasificar morfológicamente los embriones de bovinos producidos *in- vitro*.

2.3. Hipótesis

Ha: Al suplementar el fluido uterino de camélido en el medio de cultivo existe una mejoría en el desarrollo embrionario.

Ho: Al suplementar el fluido uterino de camélido en el medio de cultivo no existe una mejoría en el desarrollo embrionario.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra bovina y camélida

La posición del tracto reproductivo se encuentra debajo del recto, cerca del último segmento del intestino grueso. Los ovarios, oviductos y útero se encuentran suspendidos en la cavidad abdominal por medio del ligamento ancho (Watiaux, 2004, p. 29). El ligamento es ligeramente mayor en la parte izquierda que la derecha en la especie de camélido permitiendo alojar al feto durante su crecimiento.

El sistema reproductivo ésta constituido por órganos internos y externos: en la primera se encuentra los (ovarios, oviductos, útero, cérvix y vagina) y la segunda (vestíbulo vaginal y la vulva) (Camargo *et al.*, 2010).

3.1.1. Ovarios

En el bovino el ovario tiene la forma de almendra con un tamaño de 1,5-5 cm de largo y 1-3 cm de ancho ,constituido por medula y corteza; la corteza ovárica contiene folículos de 20mm de diámetro, el cuerpo lúteo es el segundo más irrigado después del cerebro (Hafez E y Hafez, 2000).

En el camélido, en las hembras impúberes la superficie del ovario es lisa en cambio en reproductivas tienen forma de mora con numerosos folículos (entre 3 a 12mm de ancho), el ovario izquierdo es más grande que el derecho, el cuerpo lúteo es ligeramente más grande que el propio ovario no existe una demarcación como sucede en otros rumiantes entre el cuerpo lúteo y ovario (Frank, s.f., p. 3).

Las funciones del ovario actúan como exocrinas liberación del ovulo y endocrinas esteroidogenesis (Hafez E y Hafez, 2000).

3.1.2. Oviductos

Los oviductos son conductos finos y sumamente flexuosas que se extienden desde la extremidad de los cuernos uterinos hasta el ovario (istmo, ámpula o ampolla e infundíbulo), su extremidad posterior tiene forma de embudo (Prospero y Gutierrez, 2011, pp. 14-16). La longitud aproximadamente en la bovina es de 25cm y en el camélido 20cm no encontrado diferencias en esta parte del oviducto en ambas especies (Frank, s.f., p.3).

Sus funciones son la del transporte de los ovocitos y espermatozoides así como la de proveer el sitio propicio donde se lleva a cabo la fertilización (Urzúa, 2010).

3.1.3. Útero

La hembra bovina tiene un cuerpo uterino pequeño, con dos cuernos (derecho e izquierdo). En la vaquillona el útero se encuentra ubicado en la cavidad pelviana y en la vaca que ha gestado, en algunos casos en la cavidad abdominal (Prospero y Gutierrez, 2011, pp. 14-16). Su interior está recubierto de una membrana mucosa con abundantes glándulas simples. Las carúnculas se figan por medio de los cotiledones durante la gestación. El cuerpo del útero se bifurca en dos cuernos donde se va implantar el embrión y se desarrolla el feto durante el periodo de gestación (Yanguma , 2009).

En la especie de camélido existe una marcada bifurcación de los cuernos y cuando ésta en relajación tiene una de T típica. Según Frank, (s.f.) “el cuerno izquierdo es más largo que el derecho 10-12 cm vs 7-8 cm y el cuerpo uterino es pequeño, con no más de 2.5 cm de largo y alrededor de 5 cm de ancho” (p. 3). León *et al.*, (2011) observó la ausencia de ligamento intercornual y la de los cotiledones (p. 1-8).

3.1.4. Cuello uterino o cérvix

En la especie bovina el cuello uterino tiene una estructura de tipo cilíndrica con bordes espirales, llamados anillos (generalmente son tres) los cual representan un obstáculo para la inseminación Artificial. El cérvix mide de 8 a 10 cm. Entre las principales funciones están en la de facilitar el transporte de los espermatozoides hacia la luz del útero mediante la producción de moco, también actúa como reservorio de espermatozoides, la musculatura es lisa del cérvix se relaja bajo la influencia de estrógenos (Bespín *et al.*, 2007).

En el camélido la cérvix presenta de 2-3 anillos, la parte vaginal del cérvix no supera el cm de largo y presenta pliegues radiales, cuya imagen al espejulo recuerda a una evaginación de la mucosa. No posee tapón mucoso y está cerrado, aunque no consistentemente, en la hembra no preñada la estructura cervical puede tener un significado adaptativo puede deberse por un celo permanente o la afirmación de algunos

autores se debe la adaptación a la forma del glande del pene, es una supuesta analogía con la especie porcina y asumiendo una eyaculación intracervical (Frank, s.f., p. 4).

3.1.5. Vagina

Está ubicada dentro de la cavidad pélvica, entre la vulva y el cuello del útero (Camargo *et al.*, 2010). En la hembra bovina el tamaño de la vagina es aproximadamente de 25 cm. En cambio en la hembra camélida la vagina tiene una longitud aproximada de 13 cm presenta algunos pliegues radiales alrededor del cérvix y éstos continúan longitudinalmente (Frank, s.f., p. 4). Las paredes de la vagina son elásticas y segregan una sustancia lubricante durante el parto y en los períodos de celo o calor.

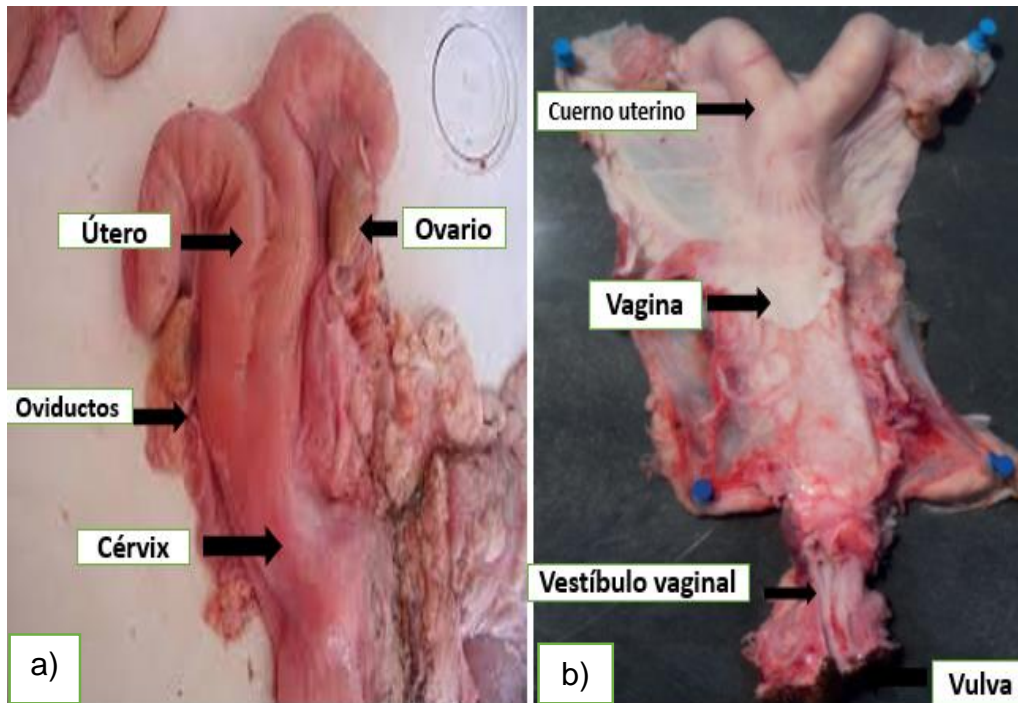
3.1.6. Vestíbulo vaginal

Conecta con la vagina y está marcado por el orificio uretral. Este representa el primer obstáculo en la inseminación artificial (IA), pues la pipeta podría ser introducida por este orificio (Fonseca, 2017).

3.1.7. Vulva

La vulva es la parte más externa y está formada por los labios vulvares derecho e izquierdo, en el bovino mide aproximadamente 12 cm de longitud y en el camélido alrededor de 3-4 cm, la parte terminal de la vulva es corta, el clítoris (homólogo del pene) está muy poco desarrollado.

La vulva en ambas especies tiene tres funciones principales: dejar pasar la orina, abrirse para permitir la cópula y sirve como parte del canal de parto (Dyce *et al.*, 2006).



Tomado: Rodriguez y Moresco (2019)

Figura 1. Anatomía Reproductiva del Ganado Bovino a) y Camélido b)

3.2. Diferencias reproductivas en el ganado bovino y camélido

En la hembra una vez que ha alcanzado la pubertad ocurren muchas variaciones en su aparato reproductor como respuesta a distintos niveles de hormonas.

En la vaca no gestante su Ciclo Estral ocurre cada 17 a 24 días (considerándose 21 días como tiempo promedio) es poliéstrica, para su estudio se consideran cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro, con distintos perfiles hormonales en cada una de ellas. Durante el proestro, la hembra se encuentra bajo la influencia de dos hormonas hipofisarias: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). En esta etapa tiene un grupo de folículos en crecimiento, que secretará estrógenos. Los estrógenos actúan sobre el cerebro de la vaca y provocan los cambios de comportamiento característicos del estro o calor. Las altas concentraciones de estrógeno causan un incremento de LH que dará origen a la ovulación la duración es de 24 a 30 horas al final del estro o calor. Después de la ovulación lo que queda del folículo se transforma en el cuerpo lúteo (CL) que secretará progesterona y prepara al tracto reproductivo para la gestación. Si no se logra la fecundación al día 14 o 15 del ciclo, el

CL es destruido por la acción de la prostaglandina F2 α (PGF2 α) y la oxitocina, que son secretadas por el útero y el ovario, respectivamente. Esto da lugar a un nuevo ciclo estral (Gasque G, 2016).

Durante el celo el toro realiza estímulos olfatorios, llegando a informar al sistema nervioso central, donde luego se concentra en el hipotálamo de aquí salen estímulos nerviosos que al pasar por la medula espinal llegan al "centro de erección", el macho monta a la hembra y ubica sus miembros anteriores de los flancos de la vaca presionándola, el pene ingresa hasta las paredes cervicales realizando en un preciso instante el "golpe de riñón" provocando la eyaculación.

En la hembra del camélido a diferencias de otras especies no presentan ciclos estrales, el celo o calor en la Llama permanece en un estado de aceptación al macho hasta por 40 días de receptividad continua con un periodo de rechazo no mayor a la 48 horas, cuando el macho copule y abracé a la hembra por sus hombros y haya un proceso de vocalización se dará la inducción a la ovulación la liberación de la hormona luteinizante (LH) pre-ovulatoria esto puede ocurrir a lo largo del año (Huanca, 2013).

Durante la cópula, el macho penetra el cérvix con el pene y deposita el semen con múltiples eyaculaciones en ambos cuernos uterinos. Este movimiento del pene dentro del útero causa inflamación de la mucosa uterina, edema e hiperemia del endometrio. La fase copulatoria puede durar entre 15-20 minutos con un rango de 5 a 60 minutos dependiendo de la presencia o la ausencia de otros animales. El intervalo entre la cópula y la ovulación es de aproximadamente 30 horas (24-48 horas) (Huanca, 2013).

3.3. Ovogénesis

La ternera nace con un crecido número de ovocitos primarios, el que varía grandemente; se calcula de unos 40 000 a 800 000. Estos disminuyen muy rápido a partir del nacimiento y después de esto lo hacen de forma gradual (Brito y Tagle, 2009).

La ovogénesis tiene lugar en el ovario y se inicia en el feto donde las ovogonias se transforman en ovocitos primarios y aquí se produce una meiosis parcial que queda interrumpida en la primera profase. Esto se desarrolla durante el período fetal y no durante el período puberal como en el caso del macho. Estas células reproductivas que

se encuentran en los folículos primarios, continúan su desarrollo transformándose en folículos De Graf que pueden llegar a ovular o atresarse. Es de hacer destacar que en la meiosis (en la hembra), de cada ovocito se genera solamente un ovulo dado que los otros tres se degeneran llamados cuerpos polares (Frank, s.f., p. 4).

La meiosis cumple la función de las células germinales (ovogonias): La reducción a un número haploide de cromosomas y la recombinación genética (Polanski y Kubiak , 1999). La ovogénesis se detiene en dos momentos específicos: Alrededor del nacimiento y en la ovulación y sólo se completará al producirse la fecundación (González, 2012).

3.4. Foliculogénesis

La foliculogénesis permite obtener un folículo preovulatorio a partir de folículos primordiales, en la vaca reproductora se necesitan 180 días para que un folículo primordial se transforme en un folículo preovulatorio o de Graff (Palma y Gustavo, 2011). Al entrar al proceso de crecimiento tienen dos destinos: la atresia o la ovulación (Fernandéz, 2003).

3.4.1. Folículos primordiales

Los folículos primordiales están formados por el ovocito rodeado de una capa de células foliculares planas (células pregranuladas) y por mecanismos intraováricos, no dependiente de gonadotrofinas, comienzan a crecer y entran en el pool de folículos en crecimientos. Los signos más precoces que indican que ha comenzado el crecimiento en este tipo de folículos son:

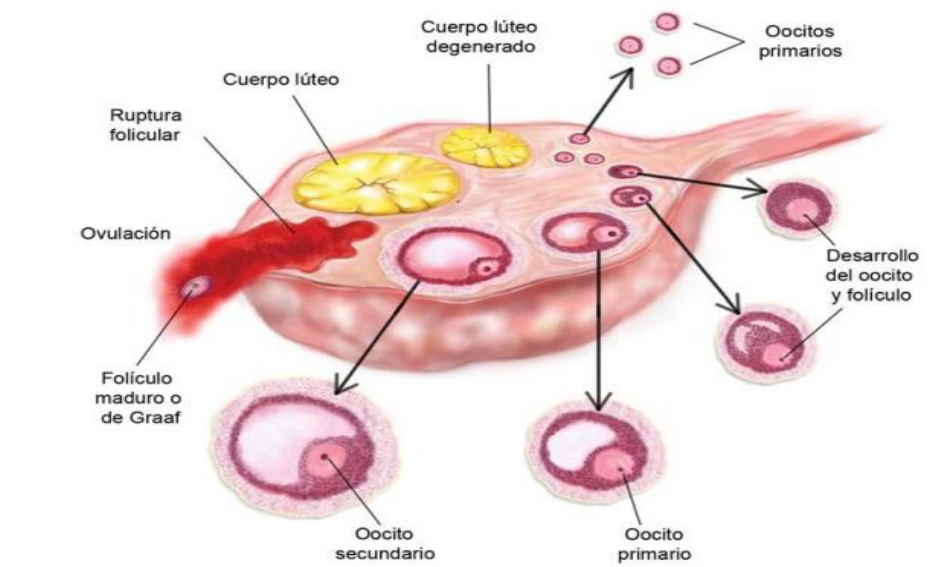
- 1) Un incremento en el tamaño del ovocito.
- 2) Un cambio en la forma de las células granulosas, pasan de planas a cúbicas.
- 3) Se comienza a formar la zona pelúcida, denominándose a esta estructura folículo primario (Baker *et al.*, 2012).

3.4.2. Folículos secundarios

Se caracteriza por la proliferación de las células de la granulosa en dos o más capas que rodean al ovocito, describiéndose ambos estados de desarrollo folicular como preantrales (Fernández, 2003).

3.4.3. Folículo terciario o antral

Se caracterizan porque las células de la granulosa empiezan a secretar líquido que causa la formación de una cavidad entre ellas; esta cavidad se la denomina antro folicular y va aumentando de tamaño en la medida que mayor volumen de líquido folicular se acumula en el mismo. Este se denomina líquido folicular, y a partir de la aparición del antro folicular a estos folículos se les denomina folículos terciarios (Ordoñez, 2005, pp. 37-62). Los folículos terciarios que han alcanzado su madurez y se encuentran listos para ovular se denominan folículos preovulatorios o De Graff.



Fuente: Spiliots (2003)

Figura 2. Clasificación morfológica de los folículos ováricos

3.5. Espermatogénesis

La espermatogénesis dura alrededor de 61 días en los bovinos (Staub y Johnson, 2008). Por divisiones mitóticas y meióticas, reducen el número de cromosomas, esto ocurre dentro del túbulo seminífero y resultan en espermatozoides (Chenoweth, 1997). Los

órganos sexuales producen hormonas antes del nacimiento a diferencia de la producción de espermatozoides comienza sólo cuando han alcanzado la pubertad, entre los siete y nueve meses de edad, siendo reducido el número de espermatozoides.

La espermatogénesis inicia cuando las células germinativas primarias emigran desde las crestas germinales y se depositan en las gónadas algún tiempo antes de la diferenciación sexual. En el feto los gonocitos se encuentran en los tubulos seminíferos y se multiplican meses del nacimiento dando lugar a las espermatogonias, las células que se originan a partir de la última división espermatogénica son los espermatoцитos primarios, como resultado de la división meiótica surgen los espermatoцитos secundarios, a lo cual al dividirse darán lugar a las espermátidas, las cuales mediante su transformación (espermiogénesis) y maduración, finalmente resultarán en espermatozoides (Cole y Cupps, 1984). Finaliza la madurez del espermatozoide en el epidídimo, cuando posee una cabeza con el material genético compactado, una cola que le otorgará la motilidad y la capacidad para fecundar al óvulo.

3.6. Producción del fluido oviductal durante el ciclo sexual

El fluido oviductal tiende a formarse por trasudación selectiva de la sangre y por secreción activa del endosalpinx (Roberts *et al.*,1975; Kavanaugh y Killiam,1988; Kavanaugh *et al.*, 1992; Greve *et al.*, 1996). Se ha demostrado que el volumen secretado en ambos oviductos varía durante el ciclo sexual.

En la vaca el fluido se produce a una velocidad de 2.0ml en el día de estro y 0,2ml por día en diestro (Roberts *et al.*, 1975) será descrito en la (Tabla 1).

TABLA 1: Cantidad del fluido oviductal bovino representado en ml por 24 horas, en fase de estro y fase luteal

Estro (ml)	Fase luteal (ml)	Referencia
2.0	0.2	Roberts <i>et al.</i> ,(1975)
3.0	0.2	Greve <i>et al.</i> , (1996)

En el porcino Carrasco *et al.*, (2008) estudio la cantidad de proteína FO, en la fase folicular tardía y la ovulación encontrando (2118,6-200,7 ug/oviducto) en la fase luteal temprano observo una disminución de fluido.

En base al ganado ovino observaron el volumen del fluido uterino en diferentes fases del ciclo estral y por sincronización de ovulación, logrando recoger en fase preovulatoria el 147,171 μL y en fase postovulación 69,857 μL con el dispositivo Pipelle de Cornier (Poveda *et al.*, 2017). Por tanto el fluido en el lumen es dependiente del ciclo estral, teniendo mayor volumen durante la fase folicular y mínimo durante la fase luteal o la gestación (Hunter R, 2012).

3.7. Composición del fluido oviductal y uterino en fase periovulatoria

La composición varía según el estado del ovario y útero, la presencia de nutrientes se debe al transporte del mismo a través de la sangre, a la síntesis y secreción por parte las células del epitelio oviductal o a la síntesis por parte de las células del cumulus presentes en el oviducto (Leese, 1988).

Acuña M. (2015) En la especie bovina estudio la detección de proteínas contenidas en el fluido (FOB y FUB), por la técnica (transcriptómico y preómico) en fase reproductiva. Hallo un elevada aportación de la proteína albumina sérica bovina (ALB), del 21 % en el fluido oviductal y 42% del fluido uterino (Véase en el Anexo 1 y 2). Apichela *et al.*, (2012) De igual forma analizo el contenido total de proteínas y enzimas en alpacas. Dando como resultado niveles altos de albumina y bajos niveles de glucosa en hembras no preñadas. “En la especie porcina la concentración de glucosa se encuentra disminuida 10 veces tras la ovulación del FO” (Nichol *et al.*,1998). En el camélido los niveles del ión cloruro se encuentran disminuidos en hembras no gestantes, mientras los otros iones no presentan variación (Apichela *et al.*, 2012).

El FO (fluido oviductal) de diferentes especies de mamíferos muestra actividad glicosidasa, sugiriendo un papel de estas enzimas en los eventos mediados por hidratos de carbono (Carrasco *et al.*,2008; Robert *et al.*, 1975; Tulsiani *et al.*,1996; Roberts *et al.*,1976). En la especie porcina la actividad de las enzimas glicosidasas muestra variaciones específicas durante el ciclo estral, pudiendo tener un papel importante en los acontecimientos reproductivos (Carrasco *et al.*, 2000). Las variaciones en la actividad enzimática detectada en la especie porcina son las siguientes: la actividad α -L-fucosidasa y β -N-acetil-glucosaminidasa aumento en la fase folicular tardía para disminuir tras la ovulación, mientras que las enzimas β -D-galactosidasa, α -D-

manosidasa y β -N-acetil-galactosaminidasa mostraron mayor actividad en fase folicular temprana, disminuyendo también tras la ovulación.

Los glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados (heparán sulfato) y no sulfatados (hialuronano) también están presentes en la especie porcina. Los niveles de GAGs en FO difieren tanto entre las partes del oviducto como entre las diferentes fases del ciclo, siendo máximos en el istmo durante el estro y disminuyendo tras la ovulación (Tienthai *et al.*,2000). Los GAGs modulan la viabilidad y la capacitación espermática durante el transporte espermático en el oviducto porcino e intervienen en la formación y liberación del reservorio espermático oviductal (Liberda *et al.*,2006; Rodriguez M, 2007).

En la especie camélida destacaron factores de interés en el oviducto, donde encontraron las metaloproteasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores específicos (TIMPs), sometidos a diferentes procesos reproductivos, también detectaron los inhibidores específicos de MMP2 y MMP9; TIMP2 y TIMP1, en los segmentos oviductales, indicando su probable regulación de la actividad proteolítica de las MMPs en el oviducto de la Llama. Sugiriendo que estas enzimas pueden participar en la preparación del ambiente oviductal para la recepción de los gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Zampini *et al.*, 2017).

3.8. Composición del fluido oviductal y uterino en el desarrollo embrionario

El fluido uterino son secretados por las glándulas uterinas. La mezcla de secreciones uterinas es referida como “leche uterina”, entre sus componentes se destacan a la proteína, carbohidratos, lípidos, minerales, aminoácidos esenciales y no esenciales.

Dado la diferencia en la concentración de componentes del fluido del oviductal y úterino (Vease en la tabla 2). Se han diseñado medios secuenciales para satisfacer el desarrollo en sus distintas etapas (Gardner y Lane, 1998 ; Gardner y Lane, 2002; Lane *et al.*, 2003; Nedambale *et al.*, 2004). Este líquido experimenta variaciones en volumen y composición a lo largo del ciclo reproductivo y de la gestación, es más abundante cuando los gametos y el embrión están presentes (Hunter, 1988).

Tabla 2. Diferencia en la composición del oviducto y útero

Composición	Oviducto	Útero
Glucosa	0,5mM	3,15mM
Piruvato	0,32mM	0,10mM
Lactato	10,5mM	5,2mM
Oxigeno	8%	1,5%
Dioxido de carbono	12%	10%
Ph	7,5%	7,1%
Glicina	2,77mM	19,33mM
Alanina	0,5mM	1,24mM
Serina	0,32mM	0,80mM

Fuente: Gardner y Lane (2002)

El piruvato y lactato sirve como fuente de energía para los embriones, desde cigoto hasta la etapa de 8-16 células (Leese y Barton, 1984) y activan el genoma embrionario 8-16 células hasta la etapa de blastocisto, los embriones utilizan la glucosa como fuente de energía para la compactación y blastulación (Gardner y Lane, 1998; Khurana y Niemann, 2000). El consumo de oxígeno y glucosa se eleva conforme el embrión avanza hacia la etapa de blastocisto (Gardner y Leese, 1988). Los aminoácidos participan como fuente energía en el desarrollo embrionario, se ha demostrado que los aminoácidos no esenciales favorecerían estadios tempranos mientras los esenciales harían lo mismo en embriones de más de 8 células (Gardner, 1998; Thompson, 2000).

Se han estudiado otros componentes que secreta el oviducto como : la oviductina, la uteroglobina, la proteína asociada a estrógenos (EGP), los factores de crecimiento, prostaglandinas, catecolaminas y los iones. La función de todas estas proteínas no se conoce completamente, pero al ver donde se localiza el producto de las secreciones oviductales da una referencia de cuál es su papel en el desarrollo y crecimiento del embrión donde sera detallado a continuación (Anzaldúa *et al.*, 2003).

3.8.1.1. Oviductina (glicoproteínas)

La oviductina es una molécula con residuos de N-acetil C galactosamina que forman parte de las secreciones oviductales en el istmo y posteriormente se asocian a la matriz de la zona pelucida durante el transporte del óvulo (Leveille *et al.*, 1987; Kan 1990; Abe y Oikawa ,1991). Se encuentra en diversas especies de mamíferos como son: el

ratón, el mandril y los humanos, se expresa de manera exclusiva en el epitelio del oviducto (Lagow *et al.*, 1999). La función específica de esta molécula aún está en estudio.

3.8.1.2. Uteroglobina

La uteroglobina es la principal proteína de secreción uterina de la coneja durante el inicio de la gestación, sin embargo se ha encontrado en el oviducto. Esta proteína es dependiente de la progesterona. En el útero esta proteína es secretada hacia la luz del órgano casi en su totalidad, mientras que en el oviducto presenta una gran capacidad de almacenamiento y un menor rango de secreción (De la Torre *et al.*, 1987).

3.8.1.3. Proteína asociada a estrógenos (EGP)

Existe un grupo de proteínas sintetizadas en el oviducto donde se ve incrementado bajo condiciones estrogénicas, siendo mayor en la ampulla, seguido del infundíbulo y por último en el istmo, se ha demostrado en cerdas, hámsters, ratones, ovejas y vacas. Experimentos realizados *in vitro*, en los que se agregó EGP al medio de cultivo de cigotos de ovinos, se observaron que estas moléculas se unen a la zona pelúcida y a la membrana plasmática de los blastómeros, por lo que aparentemente contribuyen a regular la división celular en las primeras etapas del embrión y a la formación del blastocisto (Nancarrow y Hill, 1995).

3.8.1.4. Factores de crecimiento

Diversos factores de crecimiento están involucrados en la embriogénesis en ellos se encuentran: el factor de crecimiento unido a la heparina, factor de crecimiento transformante (TGF) α y β , factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) I y II, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PAF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

En estudios realizados *in vitro* se ha encontrado que el EGF favorece la transformación del embrión hasta el estadio de blastocisto y que el factor de crecimiento similar a la insulina1 (IGF-1) causa un incremento en el número de células de la masa celular interna no así del trofoectodermo (Gardner y Kaye, 1991; Harvey y Kaye, 1992) y además estimula el metabolismo embrionario. Al respecto se ha propuesto que la insulina estimula el metabolismo y crecimiento de los embriones que en estas etapas aún no han

llegado al útero (Harvey y Kaye, 1990). En los embriones del cerdo también se han descrito receptores del IGF-I en el día 12 de la gestación, este hallazgo coincide con altas concentraciones de IGF-I en el fluido uterino (Lechter *et al.*, 1989).

En embriones de conejas hay un incremento del IGF- I el día 3 de la gestación y se ha identificado en la cubierta del producto en esta especie y promueve la transformación de mórula a blastocisto (Herrler *et al.*, 1997).

3.8.1.5. Prostaglandinas

Los embriones de diversas especies de mamíferos como bovinos, ovinos, conejos y porcinos son capaces de sintetizar prostaglandinas de las series E y F; estas sustancias se han involucrado en señales paracrinas para inducir modificaciones del endometrio necesarias para la implantación; en el caso del oviducto, el estudio de las prostaglandinas tiene como finalidad conocer la regulación del transporte del cigoto, ya que estos compuestos tienen efectos sobre la contracción del miosalpinx.

En equinos las prostaglandinas de tipo E es capaz de reconocer la gestación temprana, pasarán a la cavidad uterina 5 días después de la fertilización, ya que durante los días 5 y 6 de la gestación el embrión produce grandes cantidades de protaglandina E (StetTeenhagen *et al.*, 1972).

3.8.1.6. Catecolaminas

La noradrenalina es el mediador químico de las terminaciones de las fibras simpáticas, que inervan el oviducto favoreciendo la relajación de la musculatura lisa del órgano. En la coneja no gestante, las concentraciones de noradrenalina son elevadas en el ámpula en relación con el istmo (unión istmo-ampular) mostró una disminución 17 horas después de la inyección de un compuesto quelante. Estudios realizados en el fluido oviductal mostraron que la concentración de noradrenalina fue siempre menor en el ámpula que en el fluido del istmo, lo cual no corresponde con las concentraciones tisulares (Bodkne y Harper M, 1973). En la coneja las concentraciones de las aminas biógenas como noradrenalina, dopamina y adrenalina disminuyen en el fluido del oviducto entre el estro y la ovulación (Khatchadourian *et al.*, 1987).

3.8.1.7. Iones

Diversos iones se han identificado en el fluido del oviducto, así como algunas enzimas involucradas en el transporte de los mismos como la KATPasa, que se ha identificado en las células epiteliales del oviducto de los roedores (Ge y Spicer, 1988).

En el caso del calcio la concentración es máxima en el fluido del istmo de bovinos y ovinos en el momento del estro (Ward *et al.*, 1989). El magnesio varía a lo largo del ciclo estral de los bovinos, sin embargo aparentemente no hay variaciones en las diversas regiones del oviducto, mientras que el potasio y el sodio no muestran variaciones tanto en el ciclo estral como en las distintas regiones del oviducto, resulta interesante el hecho que la concentración de potasio en el fluido es mayor que la del suero (Grippio *et al.*, 1992).

En bovinos los espermatozoides sometidos a diversos medios del tracto genital femenino, entre ellos el fluido del oviducto, puede afectar el secuestro del calcio por parte del espermatozoide sin afectar su capacidad de fertilización (Lapointe *et al.*, 1996).

3.9. Producción *in vitro* de embriones

La producción *in vitro* de embriones, se destaca diferentes procedimientos, como la recolección de los complejos cúmulos-ovocitos (COCs), la maduración de los ovocitos, la fecundación *in vitro*, y la puesta en cultivo de los embriones obtenidos.

3.9.1. Obtención de los complejos Cumulus-Ovocitos (Cocs)

Para la obtención de COCs se lleva diferentes técnicas tanto en matadero o de hembras vivas.

De hembras vivas:

OPU. Aspiración con agujas especiales y bomba de vacío, guiada por ultrasonografía. Las técnicas de recuperación *in vivo* se han desarrollado últimamente y no obstante la "calidad" de los COCs recuperados de folículos de tamaño mediano y grande (>5 mm) es muy buena. El número que se recupera es bastante menor que el que se obtiene de los ovarios de frigorífico. (Critser *et al.*, 1986).

De hembras faenadas:

Los ovarios colectados de hembras faenadas son transportados en termos que contienen suero isotónico a 35-37 °C. La aspiración de los COCs, se realiza aproximadamente dentro de 4 a 6 horas después de faenados los animales (Filipiak y Larocca, 2010).

Según Segura P, (2016) "los folículos entre 3-4mm y 5-6mm presentan mayor desarrollo embrionario".

Para la aspiración de ovocitos se puede utilizar una pequeña maquinilla de aspiración. La recuperación es moderada y la "calidad" (capacidad de los ovocitos de completar la meiosis) es "buena", en comparación con la técnica de desmenuzamiento (con una hoja de afeitar, se corta la superficie del ovarios) en la cual la recuperación es alta, pero la calidad de los ovocitos es baja. Esto se debe más que nada a que se recuperan ovocitos de folículos muy pequeños no antrales que no han alcanzado el tamaño adecuado para ser madurados *in vitro* (Brogliatti *et al.*, 1995). La otra técnica más utilizada es por aspiración de los ovocitos se hace utilizando una jeringa de 10 ml y una aguja de 18 g x 1 1/2 pulgadas.

Benavides (2012) "Sugiere que el método de aspiración folicular y el cultivo con una tensión de oxígeno del 5% deberían ser considerados como factores adecuados para lograr las condiciones óptimas en el proceso de producción de embriones *in vitro*".

3.9.1.1. Clasificación y evaluación de los COCs

Los COCs se categorizan de acuerdo a la morfología de las células del cumulus oophorus y a las características del ovoplasma, se lleva a cabo un esquema de las diferentes categorías de COCs (Tabla 3).

TABLA 3: Clasificación de los COCs

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).

(Liebfried L y First, N L., 1979; Sato, E y col, 1990)

Al realizar la clasificación morfológica es una dificultad para el técnico seguir una regla fija, al enfocar el microscopio estereoscopio se evidencian variabilidad entre COCs y por otro lado, la cantidad de COCs, al manipular hace difícil categorizarlos adecuadamente (Senatore *et al.*, 2010; Pontes *et al.*, 2010; Ahumada *et al.*, 2006, Ordoñez, 2005; Wood y Wildt, 1997).

3.9.2. Maduración de ovocitos *in vitro*

La maduración ovocitaria es una etapa decisiva del proceso de producción de embriones *in vitro*. Acabo existen evidencias que los ovocitos madurados *in vivo* poseen una competencia superior frente a los madurados *in vitro*. Si la condiciones de maduración son muy desfavorables, se observa el bloqueo de la meiosis truncando cualquier posterior desarrollo mientras que si estas condiciones tienen pequeñas fallas, las consecuencias podrían ser cambios epigenéticos en el genoma embrionario y en la expresión génica (Niemann y Wrenzycki, 2000).

La maduración *in vitro* (MIV) es una técnica que utiliza los ovocitos inmaduros removidos de los folículos para ser cultivados en medios que simulan las condiciones fisiológicas necesarias para que alcancen el estadio de metafase II es decir maduren y puedan llevar a cabo las funciones necesarias para la fecundación y posterior desarrollo embrionario (Mamani y Valdivia, 2019). La maduración nuclearmente debe observarse la expulsión del corpúsculo polar en un periodo de 24 horas, lo que indica que el ovocito se encuentra en metafase II (MII) (Hosoc y cols, 1995).

La meiosis permanece detenida en los ovocitos que se encuentran en los folículos hasta que estos son expuestos a gonadotrofinas que permiten la continuación de la meiosis. En el proceso de maduración *in vivo* de los ovocitos, interviene la hormona folículo estimulante (FSH) para el crecimiento folicular, la hormona luteinizante (LH) que induce la maduración final y la ovulación del ovocito seleccionado. Varios autores han indicado que para que el proceso de maduración se lleve a cabo debe existir un balance hormonal en el folículo (particularmente de los esteroides) (Del campo *et al.*, 2003).

3.9.2.1. Medios de maduración de ovocitos

Los medios más destacados para la maduración de ovocitos son las hormonas folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y estradiol 17 β , medio de maduración TCM-199 (Tissue Culture Medium 199), que está compuesto por sales de Earles con bicarbonato, suplementado con piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas (albumina bovina o suero) (Palma, 2001 citado por: Ahumada M, 2009). En algunos laboratorios la adición directa de estas hormonas ha sido substituida agregando suero de vacas en estro (ECS). Este suero es suficiente para producir maduración (nuclear y citoplasmática), expansión de las células del cumulus y futuro desarrollo del cigoto.

Existe la evidencia suficiente que los ovocitos pueden ser madurados con éxito sin la presencia de suero en el medio. Recientemente, se ha estudiado un sustituto de suero sintético suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF) para reemplazar el suero fetal bovino en el medio de maduración, demostrando resultados similares a los grupos control con suero (Sagirkaya *et al.*, 2007).

Generalmente, los COCs son madurados en placas petri, en gotas (10 COCs/ 50 uL en medio de maduración) cubiertas con 10 ml de aceite mineral. Estas placas son colocadas en una estufa de cultivo en una atmósfera que contiene 5% CO₂, 39 °C y 95% humedad, por 24 horas.

3.9.3. Fecundación *in vitro*

La fecundación es un proceso complejo que resulta de la unión del espermatozoide y el ovocito. Esto señala el comienzo de la transición de ovocito a embrión. Para la correcta

fecundación *in vitro* se requiere una apropiada preparación de ambos gametos, y también de unas condiciones de cultivo favorables, con un periodo de incubación de 6-24 horas (Gordon, 2003).

3.9.3.1. Capacitación espermática

Los espermatozoides de los mamíferos sufren una serie de cambios bioquímicos y biofísicos antes de la fertilización, denominados capacitación (Wani, 2002). Para la FIV es esencial llevar a cabo dicho proceso de forma artificial, lo que implica someter a los espermatozoides a un procedimiento de selección, en el cual sólo aquellos de mejor calidad y motilidad son separados del plasma seminal, espermatozoides muertos o inmóviles, diluyentes y crioprotectores (Urrego *et al.*, 2008; Correa y Zavos, 1996).

a) Lavado y separación de espermatozoides entre los motiles y no motiles

Existen 5 técnicas entre ellos el lavado por centrifugación, swim-up, gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación (Avery y Greve, 1995). Los más utilizados en los laboratorios FIV es el gradiente de percoll y el swim-up donde serán descritos a continuación:

El percoll está constituido por partículas coloidales de 15 a 30 nm de diámetro cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP). El sistema de separación de espermatozoides consiste en la colocación, en un tubo estéril, de 2 gradientes de percoll (55% y 90%) diluido en medio de cultivo Sperm-TALP. El semen se siembra en la parte superior del tubo y se centrifuga a 200g durante 25 min a temperatura ambiente (Avery y Greve, 1995; citado por: Quispe Villalta, 2017).

El swim-up, es donde seleccionan los espermatozoides en virtud de su motilidad intrínseca, el semen es depositado en el fondo de un tubo de ensayo con el medio adecuado, se incuban por espacio de 60 minutos y sólo los de mejor motilidad nadan hacia arriba, de tal manera que al momento de retirar el contenido de la parte superior del tubo se seleccionan los espermatozoides vivos y con motilidad rectilínea progresiva (Urrego *et al.*, 2008; García, 2004). El TALP (Tyrodes modified medium) o el BO (Brackett and oliphant medium) son los medios de fecundación más comúnmente utilizados.

La metodología ha sufrido una serie de cambios con el fin de mejorar su eficiencia. Los espermatozoides que se obtienen son de buena calidad en el ámbito motil, además es fácil de realizar y barata, pero su rendimiento cuantitativo suele ser bajo siendo la tasa de recuperación, por ejemplo, 10-20%, lo cual constituye una desventaja pues se necesitaría una mayor cantidad de muestra para este tratamiento (Palma, 2001).

Adicionalmente; la morfología normal de la cabeza, la integridad de la cromatina, o la viabilidad e integridad acrosomal (Somfai *et al.*, 2012) no son tomadas en cuenta en la selección mediante esta técnica.

b) Capacitación de espermatozoides

A este medio, conocido como FERT-TALP modificado, se le agrega heparina en bajas concentraciones (entre 2-5 ug/ml), es la más usada actualmente para la capacitación espermática, penicilamina hipotaurina- epinefrina (PHE) y una concentración de espermatozoides conocida de acuerdo al reproductor que se está utilizando. Los COCs se mantienen en co-cultivo con los espermatozoides por 6 a 18 horas (Del campo, s.f.).

La concentración de espermatozoides más frecuente utilizada fluctúa entre 1-2x10⁶ espermatozoides/ml, dependiendo por cierto de la “calidad fecundante” de los espermatozoides del toro. Existen variaciones en cuanto a la capacitación espermática *in vitro*, entre los toros y en el mismo toro en diferentes eyaculados. Por lo tanto, previo a usar un toro, se hace necesario examinar su capacidad fecundante *in vitro* (Del campo, s.f.).

3.9.4. Cultivo de los embriones *in vitro*

Durante el cultivo embrionario *in vitro* ocurren cuatro eventos importantes en lo que se refiere al desarrollo desde la etapa de cigoto hasta la formación del blastocisto: la primera división embrionaria, cuyo momento de presentación es crítico para el subsecuente desarrollo del embrión (Lonergan *et al.*, 1999), la activación del genoma embrionario en la etapa de 8 a 16 células (Memili y First, 2000), la compactación de la mórula en el día cinco (Boni *et al.*, 1999) y la formación del blastocisto a los días seis o siete (Watson, 1992).

Según Lonergan *et al.* (2003) las condiciones inadecuadas del ambiente de cultivo que pudieran afectar alguno o todos estos eventos podrían tener un efecto deletéreo sobre la calidad del embrión. Esto indica que el cultivo embrionario desde cigoto hasta blastocisto es crítico para la PIV de embriones, además que durante este período se define en gran medida, la calidad de los embriones obtenidos (Rizos *et al.*, 2002; Galli *et al.*, 2003; Lonergan *et al.*, 2003a; Lonergan *et al.*, 2004).

Mientras el número de blastocistos PIV depende principalmente de la calidad de los ovocitos recuperados, la calidad de los blastocistos está determinada por el ambiente de cultivo y fertilización de los ovocitos (Calado *et al.*, 2001; Holm *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2002). La tasa de desarrollo de blastocistos *in vitro* oscila entre 30 y 40% (Marquant Le Guienne *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2001; Blondin *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003b).

3.9.4.1. Selección de embriones viables

Para el cultivo embrionario se deben tomar en cuenta solamente a los cigotos que posean blastómeros definidos, tanto en morfologías así como en aspecto de estas. Los cigotos u ovocitos que no hayan sido fertilizados, siendo esto manifestado por la extrusión del segundo corpúsculo polar, deben evitar ser cultivados debido a que al iniciar su degeneración pueden liberar sustancias reactivas de oxígeno (ROS) generando un estrés oxidativo sobre el resto de embriones y afectar su desarrollo normal (Málaga *et al.*, 2015a) .

3.9.4.2. Medios de cultivo para embriones *in vitro*

En los laboratorios emplean medios de cultivo para la reproducción asistida humana los proporcionan en diferentes casa comerciales especializadas, en mayor o menor medida, (Coy, 2012) llegan a informar sobre la composición cualitativa sin apenas ofrecer datos cuantitativos. En la reproducción de animales se venden en los laboratorios productos ya elaborados para las diferentes etapas de la FIV , sin llegar obtener la composición cualitativa y cuantitativa del producto, hace referencia solamente la cantidad en ml, lo demás es resguardada por el laboratorio, pero se llega a tener una idea mediante los diferentes estudios realizados, donde utilizan medio de cultivo convencional y estos

muestran la composición cuantitativa sin ningún obstáculo, obteniendo como resultado embriones *in vitro*.

El cultivo de embriones se basa en el uso de diferentes medios para el desarrollo de las primeras etapas embrionarias. De acuerdo a sus características los cultivos se clasifican en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y cocultivo con células somáticas; semidefinidos cuando se omite el cocultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona (Herradón *et al.*, 2007).

Sin embargo, los medios simples más utilizados para el cultivo de los embriones bovinos son: el fluido oviductal sintético, con base a los componentes encontrados en el fluido oviductal bovino, y el medio KSOM (Liu y Foote 1995), ayudando así a que cada vez más se vaya buscando componentes para la eficaz nutrición de los embriones. Recordando que estos medios todavía necesitan ser mejorados sensiblemente, puesto que el cultivo de los embriones producidos *in vitro* en el interior del oviducto incrementa notablemente la calidad de los mismos.

3.9.4.3. Sistemas de cultivo embrionario *in vitro*

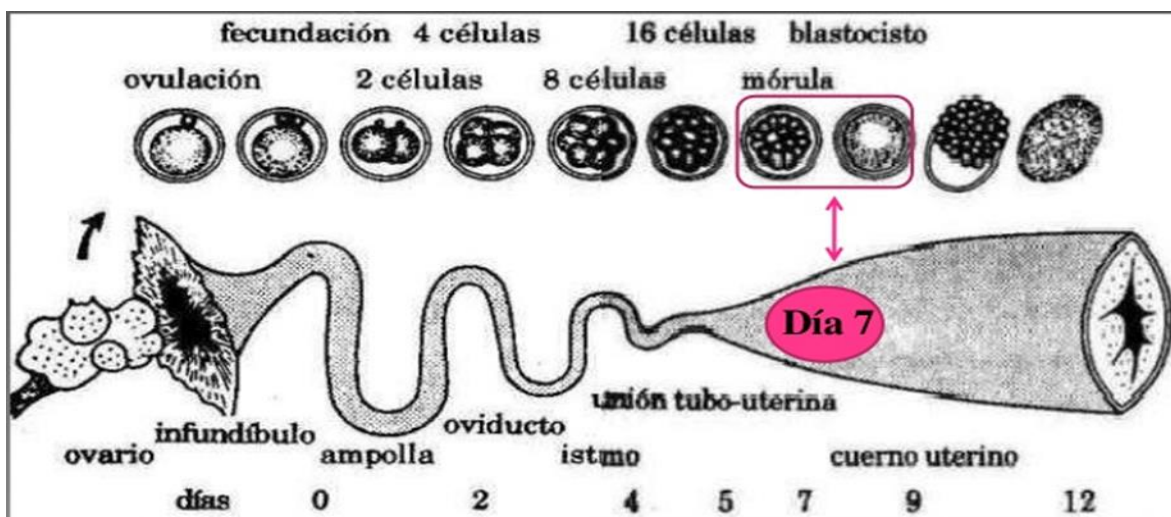
Los sistemas de cultivo pueden ser continuos con el mismo medio de cultivo durante los 7 días de CIV o puede haber un cambio de medio (SOFaa) al 3 día, ya que se ha demostrado que el uso de medio SOFaa permite la obtención de embriones de mejor calidad. El cultivo embrionario puede darse en gotas o en pocillo, tomando en cuenta la relación medio – número de embriones que se debe mantener para poder evitar la competencia por los sustratos, y favorecer el sinergismo en el desarrollo embrionario (Herradón, 2007 citado por: Málaga *et al.*, 2015b).

3.10. Desarrollo embrionario

3.10.1. Primeras Divisiones del Cigoto

El cigoto se divide con una periodicidad de unas 24 horas mientras desciende por el oviducto; observándose dos células o blastómeros simétricos y bien definidos, sin que se aumente la masa celular (Bruce y Carlson, 1990). En cada segmentación posterior

tardan 10 a 12 horas y las divisiones subsecuentes son consecutivas, formando de manera progresiva blastómeros más pequeños (Bartolomé, 2009; Austin y Short , 1982). El transporte hacia el útero, en parte regulado por la relación estrógenos/progesterona, demora en la vaca 3-4 días y el embrión llega con un total de 16 o 32 células en blastómeras (Alonso y Caccia, 2007).



Tomado de: Filipiak y Larocca (2011)

Figura 3. Desarrollo embrionario temprano en el bovino *in vivo*

El cigoto resultante empieza a dividirse en nuevas células denominadas blastómeros embrión, se empiezan a contar desde el día del estro, toda estas divisiones hasta el día 8, donde ocurren dentro de la zona pelúcida (Palma, 2008). Característica importante de esta etapa es que todos los blastómeros son idénticos y totipotentes (Climent *et al.*, 1998). Cuando llega a 8 células este es transportado a través del oviducto ya que al día 5 aproximadamente se produce el ingreso al cuerno uterino con un estadio de 16 células, el embrión continúa con su desarrollo y al día 5 es denominado mórula y se encuentra con 32 a 64 blastómeros en forma esférica, son relativamente independientes del ambiente uterino, pero en la mayoría de las especies se encuentran aún en el oviducto (Palma, 2008). Los embriones en estado de mórula se recordarse que las blastómeras están rodeadas por la zona pelúcida. La ZP (zona pelúcida) tiene propiedades antiadherentes, (Noriega, Martínez y Flores , 1995) lo cual facilitaría el desplazamiento del embrión a lo largo del oviducto y del útero (edad estimada 5 días). (Hernández *et al.*, 2008 citado por: Castañeda, 2009) (Figura3). En el aspecto morfológico la masa celular

(embrión) se encuentra ocupado por la mayor parte del espacio perivitelino a diferencia de mórula compacta su blastómeros están unidos y constituyen una sola masa compacta que ocupa entre el 60-70% del espacio perivitelino.

El desarrollo del embrión sigue su curso y comienza a formar una cavidad interna ocupada por líquido conocido como blastocele, que abarca menos del 50% del embrión; esta etapa presenta una fase crítica, que es la compresión, durante la cual los blastómeros se aplanan y se unen densamente dando lugar así al blastocisto (Figura 3), en este momento es esférico y mide solo 160-180 μ en el que se puede apreciar una pronunciada diferenciación entre las células, pudiendo observarse el disco embrionario como una masa de células interna (embrioblasto) que dará origen al embrión y la capa celular externa (trofoblasto) dará origen a la formación de la placenta (Tabla 4) (Alonso y Caccia, 2007).

Posteriormente, el blastocele se expande abarcando más del 50% de la totalidad del embrión y el embrión ocupa el 90% del espacio perivitelino, por lo que recibe el nombre de blastocisto expandido posee más de 200 células, cuya principal característica es el aumento considerable del diámetro del embrión y el adelgazamiento de la zona pelúcida; que finalmente sufre una ruptura y el blastocito eclosiona abandonando la zona pelúcida (Noriega *et al.*, 1995). Su forma es esférica con un blastocele bien definido o colapsado, luego continua con la etapa de gastrulación, durante la cual se dará la implantación y desarrollo fetal (Fernández *et al.*, 2007) (Tabla 4).



Tomado de: De Armas (2014)

Tabla 4. Estados del desarrollo embrionario bovino *in-vitro*

3.10.2. Evaluación de la calidad embrionaria

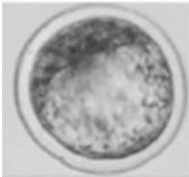
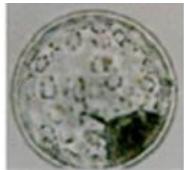
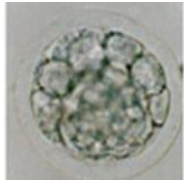
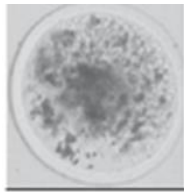
Para evaluar la calidad embrionaria existen muchos métodos alternativos, la evaluación basada en criterios morfológicos continúan siendo la más simple, rápida y confiable. La evaluación morfológica realizada con el estereoscopio es la más utilizada y generalmente se realiza después de la búsqueda y localización de los mismos. Estos pasos son importantes para la transferencia de embriones producidos *in vitro* (Palma, 2001 citado por: Catari, 2018).

Algunas de las características que se analizan para calificar a los embriones se describen a continuación: forma del embrión, color, textura de la masa celular, número y compactación de las blastómeras, diferenciación del tamaño entre blastómeras, tamaño del espacio perivitelino, presencia de blastómeras sueltas, degeneradas o detritus celulares, presencia y tamaño de vesículas (indican degeneración) y apariencia de la zona pelúcida (Galina y Valencia , 2011). Palma y Brem (1993) Manifiestan que los embriones clasificados como excelentes o buenos tiene una alta probabilidad de alcanzar

la preñez (60-70 por ciento), mientras los de muy baja calidad no concluyeron en preñeces.

Los embriones son evaluados por varios criterios, habiéndose adoptado el de International Embryo Transfer Society (IETS), que fue desarrollado por (Linder y Wright, 1983). Se describe en la (Tabla 5) los grados de calidad de embriones:

TABLA 5: Clasificación y caracterización morfológica del embrión bovino según su calidad

Imagen	Calidad	Código	Características
	Excelente o Bueno	1	Masa embrionaria esférica y asimétrica, células uniformes en tamaño, color, densidad. Consistente con estado de desarrollo. Irregularidades menores, zona pelucida esférica, sin deformidades 85% de material celular intacto y viable (sin células extruidas en espacio perivitelino).
	Regular	2	Irregularidades moderadas en aspecto, forma, tamaño, color y densidad de células. 50% material celular intacto y viable.
	Pobre	3	Irregularidades mayores en forma y tamaño de masa embrionaria y en tamaño, color y densidad de células individuales. 25% material celular intacto y viable.
	Muerte o degenerado	4	Degenerado, muerto o de una célula. Estos no son viables y deberían ser descartados.

Fuente: Stringfellow y Givens(2010); Bó y Mapletoft (2013) citado por: Limache (2015).

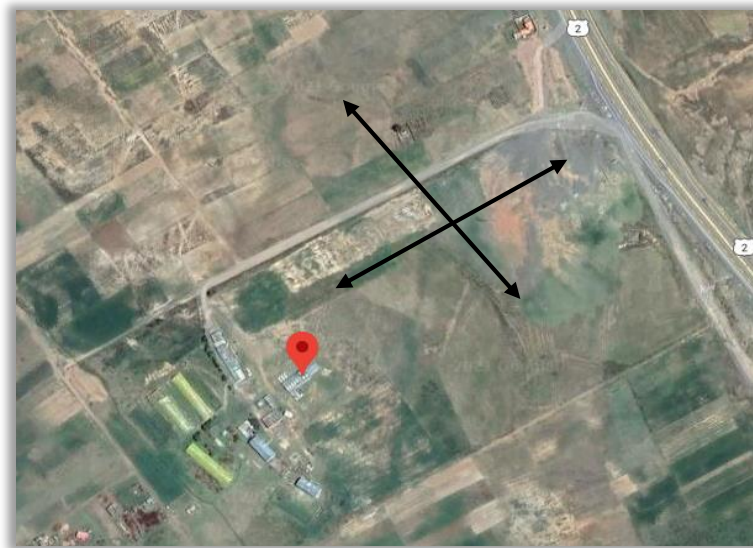
4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Localización

El presente trabajo se realizó en el centro de Mejoramiento Genético del altiplano-UAC BATALLAS, se encuentra ubicado en la comunidad de Batallas, en tercera sección municipal de la Provincia Los Andes; situado a 50 km de la ciudad de La Paz, Bolivia.

Se encuentra geográficamente a una latitud sur de $16^{\circ} 28' 51''45$ y longitud Oeste de $68^{\circ} 55' 02''72$ y una altitud de 3.838 msnm.

La temperatura media del lugar es de 10°C , y cuenta con una precipitación pluvial media de 600 mm al año (SENAMHI, 2016).



**Grafico 1. Ubicación del centro de Mejoramiento Genético del Altiplano–UAC
BATALLAS**

4.2. Materiales

4.2.1. Material biológico

Los materiales y equipos utilizados en el presente estudio son los siguientes:

-Colecta del fluido uterino de camélido

Se trabajó con 1 Llama

4.2.2. Material genético

-Ovarios de hembras faeneadas

Se obtuvieron las muestras del matadero municipal de “Los Andes” El- Alto, donde se recolectaron 286 ovarios frescos directamente de la canal de 143 vacas.

- Semen criopreservado

Se utilizó semen de toro congelado de dos razas Holstein (Ringer) y Pardo Suizo (Lider), procedente de la estación experimental de Choquenaira de la facultad de Agronomía del laboratorio criopreservación de semen.

4.2.3. Equipo de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Baño maría
- Vortex
- Balanza analítica
- Estufa
- Centrifugadora
- Estereoscopio
- Microscopio
- Nevera
- Incubadora portátil
- Micropipeta 1-10uL

4.2.4. Materiales de laboratorio

- Tubos de ensayo 10ml

- Tubo graduado 15ml
- Gradillas
- Vaso precipitado 500ml
- Vaso precipitado 50ml
- Cajas Petri 30mmx15mm
- Porta objetos
- Agujas hipodérmicas 18G
- Jeringas de 5ml
- Jeringas de tuberculina 1ml
- Estuche de disección
- Táper convencional

4.2.5. Materiales para la colecta del fluido uterino de camélido

- Tranquiliss inyectable (Acepromacina maleato 1%)
- Sonda Foley N°18
- Varilla de inseminar
- Pinza hemostática
- Agua DD (MILLIQ)
- Matraz Erlenmeyer 50ml
- Tubos falcón 50ml
- Jeringa de 20ml
- Guantes de palpación rectal
- Papel toalla
- Jabón antibacterial
- Alcohol
- Tarima

4.2.6. Materiales para la colecta de ovarios

- Suero fisiológico
- Pentagal reforzado (Antibiotico)
- Bolsas de polietileno 20x22cm
- Termómetro de precisión

- Termo
- Mini conservadora
- Maleta térmica

4.2.7. Medios para la Producción de Embriones *in vitro*

- Medio de lavado (BO-WASH)
- Medio de maduración (BO- HEPES)
- Semen preparado (SEMEN-PREP)
- Medio de fertilización (BO-IVF)
- Medio de cultivo (BO-IVC)
- Aceite mineral (BO-OIL)

4.2.8. Hormonas

- Acetato de burselerina (GNRH)

4.2.9. Otros

- Agua destilada
- Secadora de cabello
- Cocinilla eléctrica
- Antiparasitario (ParamecGoldLA+ADE)
- Vitaminas y minerales (Aumentha)

4.2.10. Material de gabinete

- Computadora e impresora
- Libreta de apuntes
- Marcadores
- Cámara fotográfica

4.3. Metodología

4.3.1. Procedimiento pre experimental



Fuente: Elaboración propia

Imagen 1. Camélidos en pastoreo

En la especie camélida se evaluó 5 aspectos fundamentales previamente a la obtención del fluido como ser:

1- Identificación

El camélido fue identificado inicialmente por sus características fenotípicas, presentando un color café en el lomo y la parte del cuello y patas de tono blanco.

2-Edad

Se realizó la verificación, separando los labios e identificando por dentro los dientes incisivos, se clasifico 4 (pinzas y medianos) como dientes permanentes, dándonos un indicativo de 4 años aproximadamente más la referencia de un parto de hace 2 años no habiendo problemas reproductivos en el animal.

3-Condición corporal

Para la condición corporal en el animal, se llevó a cabo la palpación en la superficies dorsales verificando la cubierta de grasa, asimismo se palpo bajo presión en la apófisis lumbares, determinándose con buena condición corporal, con calificación de 4, en escala calificatoria de 1 a 5 (Pérez, 2003; Vaughan, 2006).

4-Alimentación

El animal es alimentado con plantas nativas todo el año, para la investigación se tomó en cuenta los meses de noviembre a marzo, esta época es la etapa donde aumenta la cantidad y calidad de la pastura mejorando así la condición corporal del camélido.

5-Estado sanitario

Se desempeñó un medio preventivo en el animal; administrando antiparasitario de amplio espectro para parásitos internos y externos (ParamecGoldLA+ADE) 1.5ml y el reconstituyente energético vitamínico y mineral (Aumentha) 5ml. Los productos se administraron de acuerdo a su peso vivo y por vía intramuscular en el mes de noviembre rigiendo el calendario sanitario del camélido.

4.3.2. Procedimiento experimental para la obtención del fluido uterino del camélido

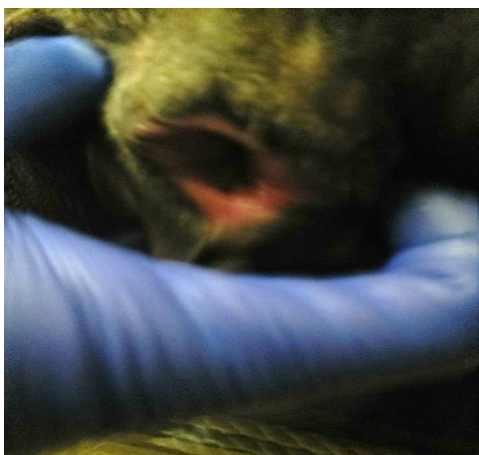
Para la obtención del fluido uterino un día antes a la Llama se administró por vía intramuscular 1ml de la hormona liberadora de gonadotropina (GNRH) conocido también como acetato de burselerina (Imagen 2), actúa como inductor de ovulación, el efecto de la hormona esta entre las 24-30 horas luego de su administración, el promedio que se tomó en este estudio es de 24 horas aproximadamente (Garcia *et al.*, s.f.).



Fuente: Elaboración propia

Imagen 2. Hormona liberadora de gonadotropina (GNRH)

Pasado las 24 horas primeramente se comprobó el efecto de la hormona donde se llevó a cabo la inspección del aparato reproductivo externamente (Imagen 3), el método consistió en separar los labios vulvares y observar las paredes de la vulva, logrando evidenciar de un tono rojizo, se realizó la comparación con lo verificado un día antes durante la administración (GNRH), donde se presencié de color blanquecino estas diferencias nos da un indicativo de ovulación en el animal.



Fuente: Elaboración propia

Imagen 3. Inspección de la vulva

Luego se administró 1ml de tranquilizante (Acepromacina) por vía intramuscular de acuerdo a su peso vivo, para su efecto se esperó 15 minutos aproximadamente (Imagen 4).

En seguida del efecto se procede al traslado del animal al brete, previamente se adecuo un brete de bovino para camélido, incorporando una tarima de acuerdo a su peso y longitud corporal.

El camélido una vez trasladado es introducido al brete subiéndolo a la tarima para luego proceder con la inmovilización, consistió en cubrirle los ojos con un paño evitando su visualización, seguidamente se amarro con la cuerda ambas patas traseras y se procedió a jalar la cuerda en dirección contraria y con ayuda de la mano se presionó la región de la grupa hacia abajo, para finalmente colocarla en decúbito ventral (posición copuladora), luego se desarrolló el nudo en la región posterior de la grupa y en la región anterior de la cruz, facilitando el manejo y evitando algún tipo de movimiento en el animal (Imagen 5).

Posteriormente con ayuda de un guante de palpación rectal estéril se realizó la palpación del aparato reproductivo por vía rectal, antes es retirado todo el contenido fecal del recto, permitiendo identificar la cérvix y ambos cuernos uterinos.

Distinguiendo el aparato reproductor se limpió la vulva y la región perianal con ayuda de jabón antibacterial y un papel toalla, evitando alguna contaminación en la muestra.



Fuente: Elaboración propia

Imagen 4. Tranquilizante (Acepromacina)



Fuente: Elaboración propia

Imagen 5. Sujeción a la Llama

Para la colecta del fluido uterino en la Llama, se procedió a introducir suavemente el catéter flexible en el vestíbulo de la vulva, separando los labios vulvares, a medida que se introducía era retirado la bolsa de esterilización, el catéter estaba compuesto por dentro de una varilla de inseminar y por fuera la (sonda Foley de 2 vías N°18) conforme al tamaño del útero.

El catéter se introdujo friccionando la cérvix permitiendo llegar al cuerno uterino seguido es extraído cuidadosamente el estilete (varilla de inseminar) quedando dentro solo la sonda Foley (Imagen 6).

Posterior con una jeringa de 20ml a través de una de las vías se inflo un pequeño balón de goma de 15cm³ de aire para ocluir la luz del útero, esto con el fin de fijar el catéter y prevenir todo el reflujo del fluido.

Luego con una jeringa de 60ml se extrae del matraz el agua DD (MIIIIQ) y se administra a una de las vías, llegando a través hacia el cuerno uterino y proceder con la obtención del fluido, la colecta efectuada retorna nuevamente por la misma vía donde es recuperado en un matraz estéril de 250ml (Imagen 7).



Fuente: Elaboración propia

Imagen 6. Introducción de la Sonda Foley N°18



Fuente: Elaboración propia

Imagen 7. Colecta de fluido uterino del camélido

En el proceso de laboratorio la muestra colectada anteriormente es llevado a la cámara de flujo laminar, para prevenir la contaminación de la muestra, a continuación se realizó la homogenización para asegurar una mezcla adecuada.

Con una micropipeta adosado a un tips se procede a extraer 7uL de fluido uterino, luego es transportado a un tubo eppendorf de 1.5ml introduciéndolo en el fondo de ello (Imagen 8), una vez depositado prontamente se sella la tapa y seguido es trasladado a un vaso precipitado, se repitió esta técnica unas 15 veces, más adelante se congelaron a -80°C hasta la espera de su aplicación en el medio de cultivo (Imagen 9).



Fuente: Elaboración propia

Imagen 8. Procesamiento del fluido uterino de camélido en laboratorio



Fuente: Elaboración propia

Imagen 9. Muestra de fluido uterino de camélido en la conservadora

4.3.3. Colecta de ovarios en matadero

Los ovarios de bovino fueron obtenidos de hembras sacrificadas en la planta de sacrificio del Matadero Municipal de "Los Andes" EL ALTO, dentro de sus áreas complementarias internas proceden con la zona de faeno, evisceración y el área de inspección y sellado.

En la zona de evisceración se concretaba con la recolección de los úteros, para luego transportarlos a una zona viable, procediendo con la extracción de los ovarios de ambos cuernos uterinos derecho e izquierdo, con la ayuda de una tijera curva (Imagen 10).



Fuente: Elaboración propia

Imagen 10. Colecta de ovarios en planta de faeno

Los ovarios extraídos son depositados en bolsas de polietileno (20 x 22 cm), por dentro estaba complementado con suero fisiológico (0,9%NaCL) 30ml + antibiótico (pencilina + estreptomicina 6.000.000UI/ml) 5g, se conservó dentro un termo con agua a 38°C.

La muestra una vez concretado, es transportado durante una hora y media hasta el respectivo laboratorio, en el trayecto del camino se efectuaba la toma de temperatura de 37-39°C un rango que se mantiene para evitar la desintegración de ovocitos.

Para la colecta de ovarios no se realizó ningún registro reproductivo de la hembra bovina como el estado de salud en que la que se encontraba.

4.3.4. Recuperación de ovocitos

En laboratorio la muestra es evaluada nuevamente la temperatura conservándolos estables (Imagen 9), del termo es extraído la muestra con el propósito de retirar todo el excedente mediante un corte, evitando salir los ovarios dentro de la bolsa, en un vaso precipitado son introducidos y llevados a baño maría a 38.5°C.



Fuente: Elaboración propia

Imagen 11. Toma de temperatura de la muestra en laboratorio

Para la limpieza se procedió a retirar cada ovario del baño maría con la ayuda de una tijera Kelly, así mismo se realizó el corte de tejidos adyacentes de los cuernos uterinos, ligamentos y segmentos del útero con la que se encontraban.

Luego se sometieron al lavado con (suero fisiológico + antibiótico) atemperado y una jeringa sin embolo (Imagen 12), seguidamente se realizó el secado con un pedazo de papel de cocina retirando todo el material contaminante sangre y detritus, se llevó a cabo este proceso para la buena visibilidad de los folículos y evitar la contaminación de los ovocitos.



Fuente: Elaboración propia

Imagen 12. Retiro de detritus del ovario

Para la aspiración de ovocitos se utilizó una jeringa de 5ml sin embolo adosada a una aguja 18G, se efectuó la punción cerca a los folículos seleccionados de forma horizontal con el bisel hacia abajo, facilitando aspirar folículos entre 3 a 6mm de diámetro.

Su contenido fue colocado en un tubo de ensayo de 10ml a una temperatura de 38.5°C, una vez concluido con el llenado se dejó sedimentar por 10 minutos, luego fue sacado cuidadosamente el líquido folicular con la pipeta fip adosada a una jeringa de tuberculina, dejando solo los ovocitos sedimentados en el tubo de ensayo.

En una caja Petri fueron vertidos los ovocitos y con el medio de lavado (Bio-Wash IVF) se en juago por dentro del tubo evitando quedar ovocitos, por otra parte en el estereoscopio se procedió con la búsqueda de los ovocitos.

En otra caja Petri el (Bio-Wash IVF) es llevado en forma de microgotas, para el lavado de los ovocitos colectados, dejándolos libres de impurezas, accediendo a un mayor enfoque en la contabilización y clasificación según categoría.



Fuente: Elaboración propia

Imagen 13. Aspiración folicular

4.3.5. Método de maduración de ovocitos *in vitro*

4.3.5.1. Preparación de materiales y el proceso de estabilización del medio (BO-HEPES)

Para la formación de dióxido de carbono se adaptó una bomba CO2 con un envase de plástico 350ml acoplado de válvulas, en su interior se incorporó 5g de polvo efervescente

posteriormente se cerró y por medio de la válvula se extrajo aire, luego se introdujo 10ml de agua bidestilada, originando la liberación de CO₂ en el interior de depósito.

Para incubar la muestra se acondicionó un táper convencional prefabricado de 500ml tipo rectangular, el dispositivo se adecuó de acuerdo a la metodología de Suzuki *et al.*, (1999).

Sobre la tapa del táper se ejecutó un agujero permitiendo incorporar un tapón de tubo de ensayo, luego fue sellado con pegamento, al tapón se le insertó una aguja de 18 G x 1 1/2" y se unió un tubo de goma de 7cm de largo, funcionando en la extracción de aire y la agregación de agua destilada.

Para la preparación del medio de maduración (BO-HEPES) se procedió en sacar del frasco (700uL) con una jeringa de tuberculina, pronto se depositó a un tubo eppendorf, por otra lado se extrajo de la bomba de CO₂ (2ml) y se introdujo nuevamente junto al medio de maduración, regulando el pH de alcalino a ácido.

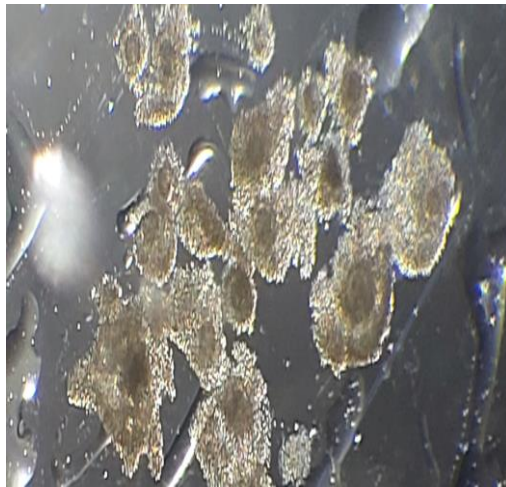
El contenido es retirado del tubo eppendorf y puesto a una caja Petri (30mmx15mm) en forma de microgotas (4 alrededor y 1 al centro), posteriormente se cubre con aceite mineral (2ml). En otro lado se procede con el pesaje 0,24g del efervescente donde es vaciado en otra caja Petri.

El (BO-HEPES) + el efervescente es conducido al táper convencional se lo tapa y prontamente se extrae de la goma 120ml de aire de su interior con la ayuda de una jeringa de 20ml y un pinza hemostática, luego es introducido por la misma goma 1ml de agua bidestilada junto al efervescente, formando el CO₂ en su interior, se pinza la goma evitando salir todo el contenido. El taper es transportado a la incubadora a 38.5°C por un periodo de 1 hora para su posterior estabilización (Anexo 16).

4.3.5.2. Maduración de ovocitos

Para la maduración de ovocitos se procedió a extraer de la incubadora el medio de maduración, transportándolo a la platina térmica a 38.5°C, los ovocitos aspirados y seleccionados anteriormente, por medio del estereoscopio se introdujeron al centro de la microgota de maduración separándolos entre ellos.

Para la incubación, el medio de maduración de ovocitos junto al efervescente 0,24g fueron introducidos al táper convencional donde luego con la tapa se procedió a tapanlo, se extrajo de su interior 120ml de aire y seguidamente se incorporó 1ml de agua bidestilada cercano al efervescente produciéndose el CO₂, se transportaron a la incubadora a 38.5°C por un periodo de 24horas.



Fuente: Elaboración propia

Imagen 14. Expansión del Cumulus ophorus (CoCs)

4.3.6. Fertilización de ovocitos *in vitro*

4.3.6.1. Preparación del medio FER-TALP y SEMEN-PREP

Para el medio FER-TALP se realizó el mismo método de estabilización, explicado anteriormente en el medio de maduración.

Del medio FER-TALP se extrajo 700uL + 2ml de CO₂ a un tubo de ensayo seguido con el ph-metro se procedió a verificar el medio de fertilización dando un indicativo de 6.8 optimo, pronto se sacó con la jeringa de tuberculina todo el contenido del tubo de ensayo y se trasladó a una caja Petri, se cubrió con 2ml de aceite mineral.

El medio de fertilización más el efervescente fueron introducidos a la caja Petri para luego proceder a incubar durante 1 hora, a una temperatura de 38,5°C con un 5% de CO₂.

Para la capacitación de los espermatozoides, se sacó del frasco 1000uL SEMEN -PREP+ 2ml de CO₂, a un tubo de ensayo dejándolo por 60 segundos en baño maría a 38.5°C.

4.3.6.2. Pasos para la capacitación de espermatozoides por la técnica de *swin-up*

Se utilizó semen congelado comercial de la raza Holstein y Pardo suizo, los pasos se aplicaron de la misma forma para ambas razas donde será explicado a continuación.

Del tanque criogénico se procede a extraer la pajuela y llevarlo luego a descongelar durante 30 segundos en baño maría, se la seca y con ayuda de la tijera se realiza un corte en el extremo de la pajuela donde se vierte todo el contenido en el medio SEMEN-PREP previamente atemperado (Imagen 15), se efectúa nuevamente el corte en la parte superior evitando quedar contenido dentro de la pajuela.

Con un tapón se procede al sellado y seguido se inserta al centro del tapón 2ml CO₂, se lleva a incubar durante 1 hora, evitando los reflejos de luz en la muestra.

Finalizado el tiempo de incubación se lleva centrifugar a 3500rpm por 10 minutos a una temperatura de 38.5°C, luego se elimina el sobrenadante (espermatozoides muertos) dejando solo el pellet en fondo, contiendo los espermatozoides capacitados, con la micropipeta se homogeniza con el FER-TALP y se extrae 2ul de espermatozoides capacitados al portaobjeto para observar al estereoscopio su motilidad masal.



Fuente: Elaboración propia

Imagen 15. Incorporación de semen al medio SEMEN-PREP

4.3.6.3. Fertilización *in vitro*

Para realizar la fertilización se verifico primeramente la maduración de los ovocitos observando con el estereoscopio el grado de la expansión del cumulus ophorus (Imagen 14).

Prácticamente de la incubadora se extrajo el medio FER-TALP y con este medio se procedió el lavado de los ovocitos unas tres veces, para finalmente ser introducidos al centro de la microgota junto a los espermatozoides capacitados utilizándose 4uL, los espermatozoides fueron esparcidos alrededor de los ovocitos para la posible fecundación.

El táper se acondiciono a 38,5°C con 5% de CO₂, realizando se la extracción de aire de 120ml, asimismo se adiciono 1ml de agua bidestilada junto al efervescente 0,24g, generando entre ambos el CO₂, se incubo durante 24horas.

4.3.7. Medio de cultivo *in vitro*

Durante el medio de cultivo los presuntos cigotos fueron retirados de la incubadora y llevados al estereoscopio para observar si han emitido el segundo corpúsculo polar, sin embargo no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de las primeras blastómeras como criterio (Fukui, 1990).

El medio de cultivo anteriormente fue incubado con la misma técnica del medio de maduración no habiendo ninguna diferencia a excepto del cambio de medio de cultivo (BO-IVC).

El medio de cultivo fue retirado de la incubadora y llevado al estereoscopio con los presuntos cigotos, previamente se llevó a cabo el pipeteo con una jeringa de tuberculina adosado a un tips efectuando la búsqueda y el lavado (2-3 veces) logrando remover los espermatozoides y el restante de células del cumulus que rodean a los presuntos cigotos.

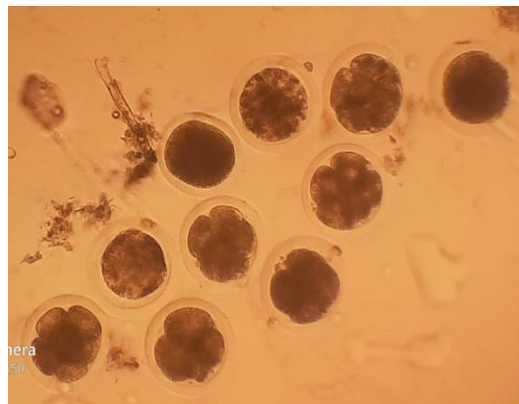
En esta etapa se adiciono el fluido uterino de la Llama al medio de cultivo: primeramente consistió en extraer la muestra de la conservadora y prontamente llevar a descongelar en baño maría durante 30 segundos, se extrajo 1uL del interior del tubo eppendorf con

la ayuda de una micropipeta, inmediatamente fue introducido al medio de cultivo junto a los presuntos cigotos.

El cultivo se mantuvo por ocho días a 38,5°C, con el 5% de CO₂ en aire y 95% humedad relativa.

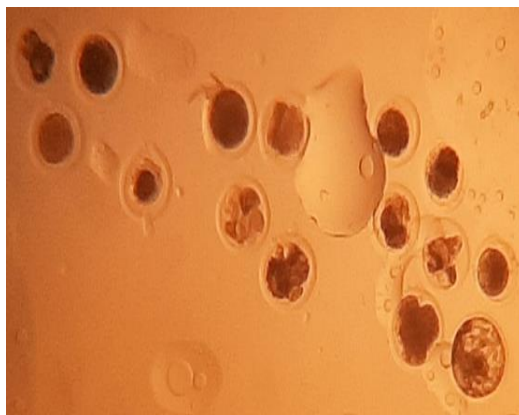
Sin la adición del fluido uterino se realizó la renovación del medio de cultivo a las 48 horas, para el lavado se utilizó el BIO-Wash 700uL en un tubo falcón de 15ml a una temperatura de 38.5°C donde fueron introducidos dentro los presuntos cigotos, luego mediante agitación mecánica se utilizó el vortex en un tiempo de 30 segundos, logrando desnudar el cumulus ophorus y permitiendo observar más visible la zona pelucida y el desarrollo embrionario.

Posteriormente para el día 8 se evaluó el porcentaje de embriones en sus diferentes estadios (Imagen 16, 17).



Fuente: Elaboración propia

Imagen 16. Visto por microscopio 10x: Día 3 (4-8 células)



Fuente: Elaboración propia

Imagen 17. Visto por microscopio 10x: Día 8 (16 -32 células-Morula y blastocisto)

4.3.8. Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro*

El desarrollo de los embriones fue evaluado con la ayuda de un estereoscopio y un microscopio de 10x a las 48 horas y al día 8 de cultivo, observando el total de embriones divididos y el número de blastómeros, al finalizar el periodo de cultivo se registró el número de mórulas y blastocistos.

No existe una clasificación para evaluar embriones producidos *in vitro*, como la existente para embriones *in vivo*. Sin embargo, la experiencia indica que estos blastocistos son probablemente más sensibles.

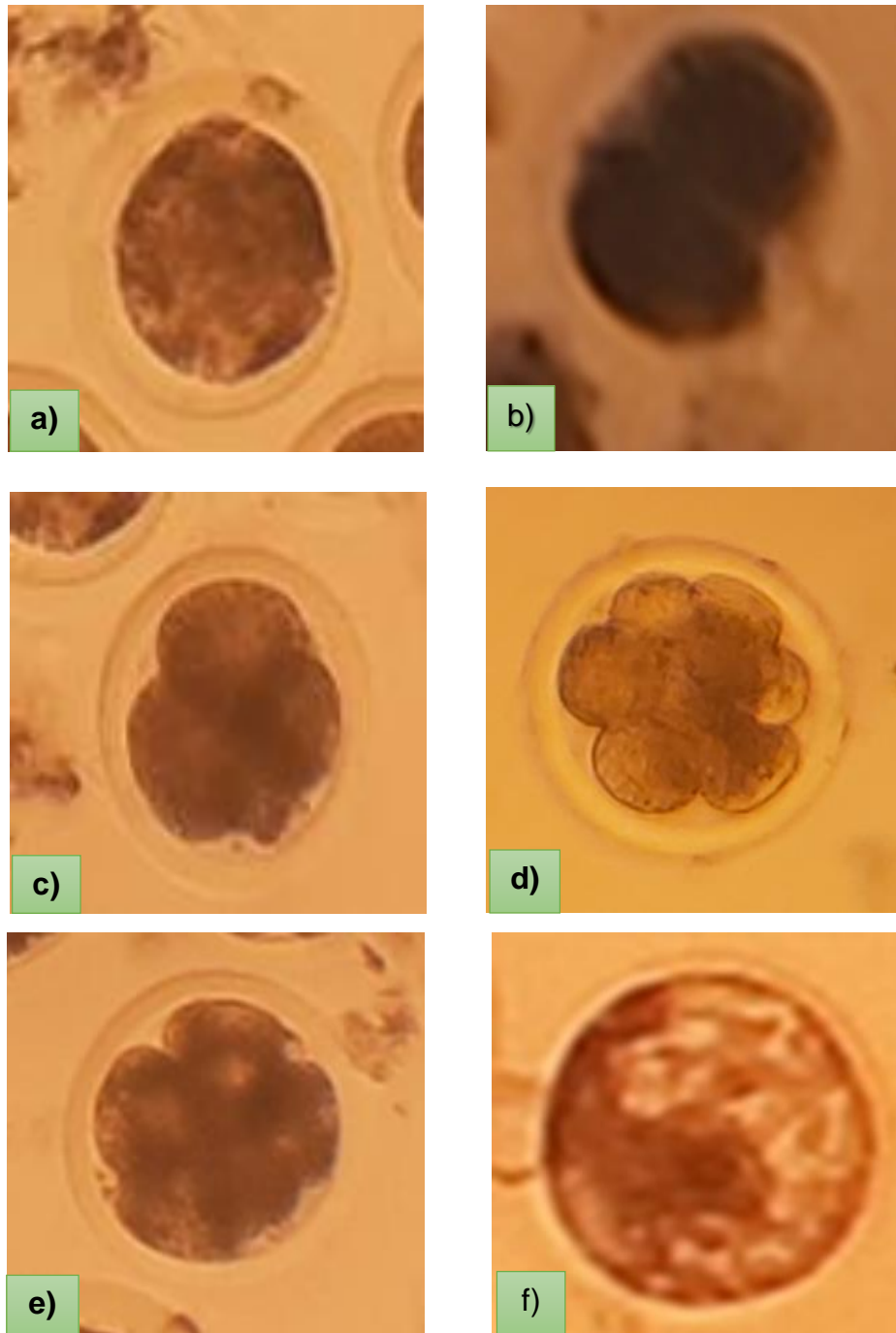
Su estadio se efectuó de manera numérica de la siguiente manera: (Tabla 5, Imagen 18)

TABLA 5. Estadios del desarrollo embrionario de la especie bovina

CLASE	DÍA	ESTADO DE DESARROLLO
a)	1	1 célula, pronucleo y segundo corpusculo polar – Cigoto
b)	2	2- Células
c y d)	3	4 -8 Células
e)	5	16-32 Células-Mórula
f)	7	64 Células Blastocisto Temprano-Trofoblasto y Macizo Celular Interno
f)	8	Blastocisto Expandido
	9	Blastocisto Eclosionado

Fuente: Del Campo *et al.* (2003), citado por: Susaño *et al.* (2017b)

Estadios del desarrollo embrionario según su clasificación



Fuente: Elaboración propia

Imagen 18. Desarrollo embrionario temprano del bovino *in vitro*

4.4. Análisis estadístico

Para determinar el fluido uterino de la Llama como suplemento en el medio de cultivo para el desarrollo embrionario bovino, se evaluaron mediante comparación de proporciones con la prueba de Ji-cuadrado.

Los resultados se compararon los porcentajes del desarrollo embrionario a las 48 horas y al día ocho por medio de la adición del fluido uterino al medio de cultivo, como también la calidad embrionaria de acuerdo a la clasificación de IETS.

$$\chi^2 = \sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

χ^2 = Variable de respuesta

o_i = N° de observaciones en la i-ésima clase

e_i = N° esperado en la i-ésima clase

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para la interpretación de los resultados, serán representados en dos grupos: Medio de cultivo sin fluido uterino y el segundo al medio de cultivo con adición de fluido uterino de Llama.

TABLA 6. Porcentaje de la maduración de ovocitos *in vitro* de bovino para medios de cultivo convencional +fluido uterino de camélido

Medio de cultivo	Nº ovocitos	Nº de ovocitos madurados	% de ovocitos madurados
Medio de cultivo convencional	218	150	68,81%
Medio de cultivo convencional + FU de Camélido	210	142	67,62%

Fuente: Elaboración propia

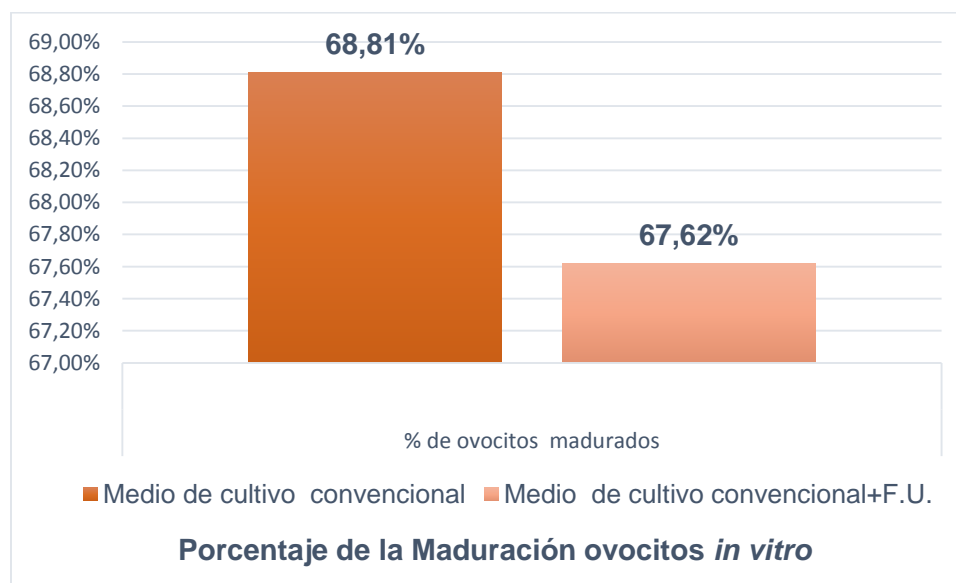


Figura 4. Porcentaje de la Maduración de ovocitos *in vitro*

Para la maduración de ovocitos *in vitro* se aspiraron 428 ovocitos para ambos grupos donde llegaron a madurar el 68,81% para el medio de cultivo convencional y para el medio de cultivo suplementado con fluido uterino de camélido el 67,62%, no habiendo diferencias para ambos datos (Tabla 6 y Figura 4).

Los resultados son superiores significativamente frente a los demás estudios en condiciones de altura de la zona del Altiplano Boliviano, con un periodo de incubación de 24 horas. Mamani *et al.*, (2017b) obtuvo como dato el 61,79%, adicionando la hormona luteinizante (LH) al líquido folicular a diferencia de (Carazas *et al.*, 2018) logró obtener el 44,73% al suplementar la hormona Luteinizante (LH) y GnRH (eCG) en el medio de cultivo sintético TCM-199, esto puede atribuirse al suplementar diferentes componentes en la maduración *in vitro*. En el estudio actual se trabajó con medio de maduración comercial (BO-HEPES) sin ninguna suplementación alguna no afectando en la maduración a cambio se logró obtener una mayor expansión de ovocitos con un cúmulo compacto formado por varias capas de células.

Nagano *et al.*, (2006) menciona que al obtener mayores porcentajes de maduración con una adecuada clasificación morfológica se tiene efectos positivos, alcanzando el más alto porcentaje de blastocistos después de la FIV. Juntamente es la clave para el éxito de un embrión saludable para el sistema de producción *in vitro* y está directamente relacionado con la calidad del ovocito, es decir, ovocitos calidad 1 darán mejores embriones que los ovocitos calidad 2 y estos a su vez que darán mejores embriones que los de calidad 3 (Holm y Henrik, 1998).

TABLA 7. Porcentaje del desarrollo embrionario *in vitro* bovino cultivados a las 48hrs con el medio de cultivo convencional + la adición del fluido uterino de camélido

Medio de cultivo	Nº de cigotos cultivados	Nº de embriones en desarrollo	% de embriones en desarrollo
Medio de cultivo Convencional	121	38	31,40%
Medio de cultivo convencional + FU de Camélido	119	44	36,97%

Fuente: Elaboración propia

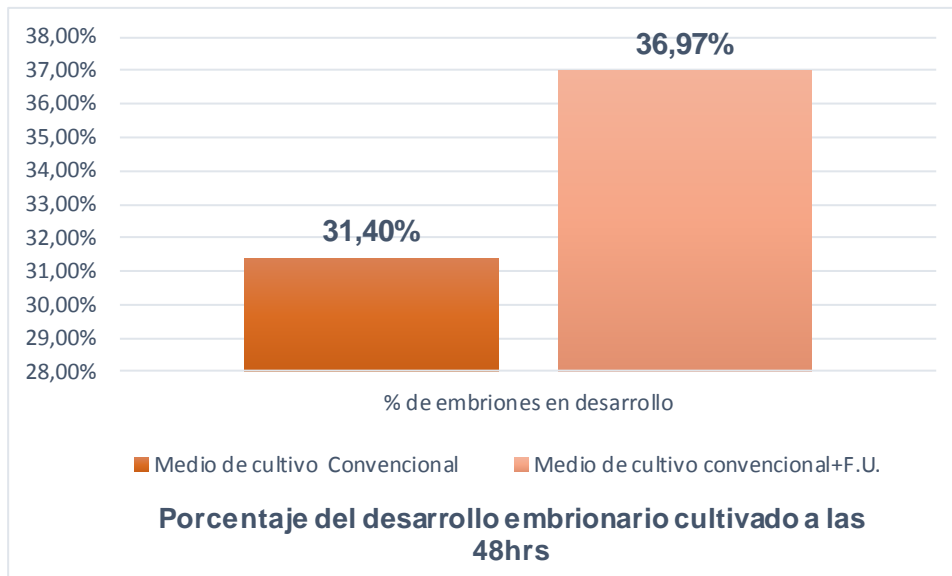


Figura 5. Porcentaje del desarrollo embrionario cultivado a las 48 horas

En la tabla 7 y figura 5 muestra la tasa de la división embrionaria a la 48 horas, luego de la fertilización, obteniendo como resultado el 36,97% para la adición del fluido uterino con respecto al medio de cultivo no suplementado del 31,40%, no habiendo diferencias en ambos grupos, cuando fueron sometidos a la prueba de Ji-cuadrado ($p < 0,05$).

(Pahuara F, 2015b) con el medio SOFaa obtuvo el 39,19% similar a nuestro resultados del 36,97% con adición del fluido uterino, esto debido a que utilizó la misma técnica Swin up, produciendo la capacitación y reacción acrosomal, permitiendo la penetración de espermatozoides a través de la zona pelúcida.

Es particularmente interesante considerar el hecho de que el mayor problema del cultivo de embriones bovinos *in vitro* indicado en los trabajos de diversos autores, ha sido el bloqueo de las divisiones celulares que experimentan los embriones cuando alcanzan el estado de 8-16 células (Wright y Bondoli, 1981; Eyestone *et al.*, 1987; Telford *et al.*, 1990). En esta investigación se vio una mejoría a razón al bloqueo logrando obtener desarrollo de 8 células, Otros estudios han demostrado que los cigotos bovinos que se dividen tempranamente a las 32-36 horas post-FIV, son más capaces a desarrollar al estadio de blastocisto, comparado a los que se dividen más tardíamente (Lonergan *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 1993).

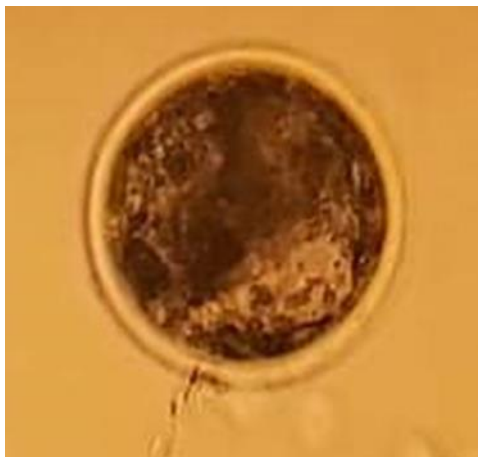
En los estadios más tempranos (embriones de 1-2 células) se utilizan el piruvato y/o el lactato y algunos aminoácidos pero no la glucosa. De hecho, la adición de glucosa a los embriones bovinos fertilizados resulta en un descenso del desarrollo embrionario posterior (Takahashi y First, 1992). De acuerdo a la consideración del anterior estudio puede ser esta la causa donde se observa una disminución en el porcentaje del clivaje de embriones al inicio, en su componente del fluido uterino se evidencia la glucosa pero en bajas proporciones no afectando a tan extremo el desarrollo embrionario en la siguientes divisiones.

TABLA 8. Porcentajes del clivaje para la producción de embriones *in vitro* bovino cultivados al día 8, mediante la adición del fluido uterino de camélido al medio de cultivo

Medio de cultivo	Nº de cigotos cultivados	Nº de mórulas	Nº de blastocistos	Nº de blastocistos Expandidos	Total de embriones
Medio de cultivo Convencional	121	13(10,74%)	5 (4,13%)	0	18(14,88%)
Medio de cultivo convencional + FU de Camélido	119	15(12,60%)	7(5,88%)	2(1,68%)	24(20,17%)

Fuente: Elaboración propia

Los resultados respecto al segundo objetivo sobre el porcentaje del clivaje embrionario cultivados al día ocho suplementados con fluido uterino de camélido se demostró por medio de prueba de Ji-cuadrado, donde existe diferencias significativas ($p > 0,05$) en ambos medios de cultivo lo cual demuestra claramente que no existe una relación entre ambos tratamientos, existiendo en sus resultados una mejoría con la adición del fluido uterino efectuando su clivaje hasta blastocisto expandido del 1,68% a diferencia sin la suplementado del 0% (Imagen 19 y 20) .



Fuente: Elaboración propia

Imagen 19: Blastocisto expandido (Bx)

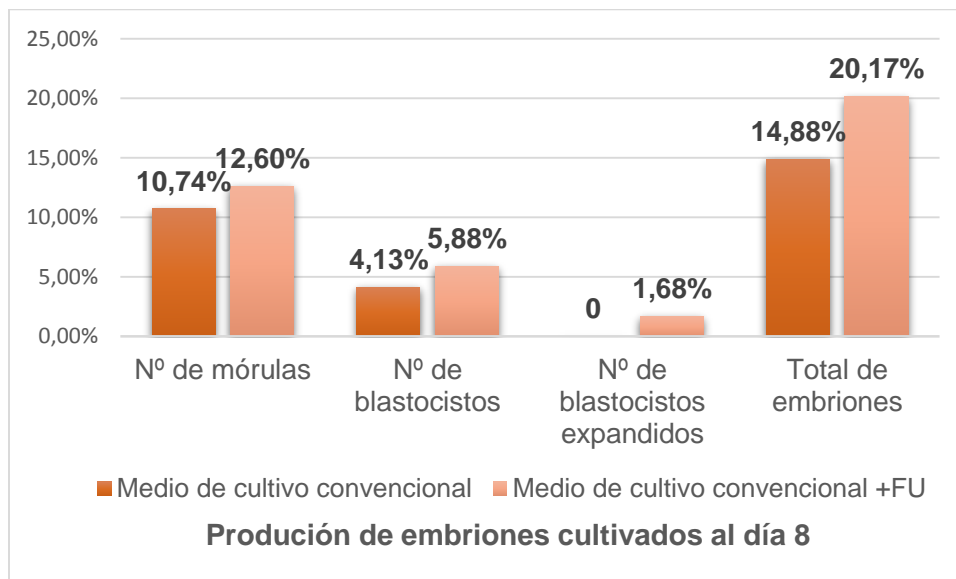
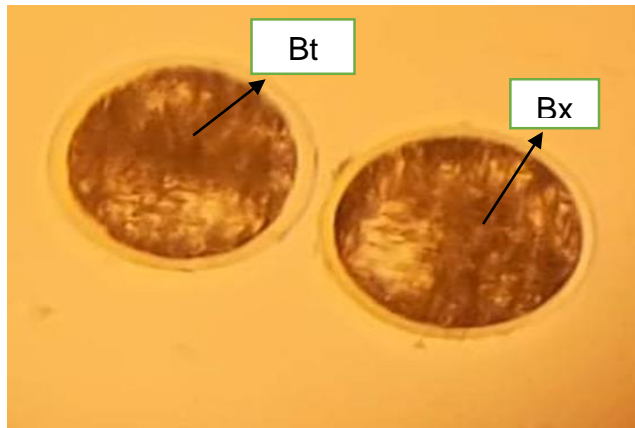


Figura 6. Porcentaje del clivaje para la producción de embriones *in vitro* cultivados al día 8

De esta forma se observa en tabla 8 y figura 6 el 12,60% mórulas, 5,88% blastocistos, 1,68% blastocistos expandidos con un total del 20,17%, con respecto al medio de cultivo convencional del 10,74% mórulas, 4,13% blastocisto, 0% blastocistos expandido con un total del 14,88%.



Fuente: Elaboración propia

Imagen 20: Blastocisto temprano (Bt) Blastocisto expandido (Bx)

(Arista R. 2019b) trabajo con semen congelado de toros homocigoto de la raza aberdeen angus, donde adiciono el fluido oviductal sintético al medio de cultivo como resultado en etapa de blastocisto expandido obtuvo para el toro JTRM 0,82% y 1,13% para el VTRM, en cuanto a nuestro actual resultado no existe diferencias. Sin embargo con las células del epitelio oviductal (Muci *et al.*, 2000) obtuvo 26,7% superior al presente estudio, efectuó mediante una incisión y raspado al oviducto, donde adiciono el componente al medio de cultivo logrando se evitar el bloqueo en el desarrollo, de tal forma que los embriones alcanzaron la etapa de blastocisto expandido viables y de calidad al día ocho de cultivo dentro del tiempo establecido.

El mayor aporte por parte del suero sanguíneo a los fluidos del oviducto y útero son las albuminas, α y β , γ - globulinas y lipoproteínas de alta densidad. En cambio el aporte de las inmunoglobulinas es mayor en el fluido uterino. Esto puede estar asociado al aumento de la motilidad uterina durante el estro y la consecuente entrada de microorganismos. En la especie bovina influyen el contenido de IgG donde actúa como defensa de microorganismos (Alavi-Shoushtari *et al.*, 2014). Conforme a las investigaciones, puede ser un efecto benéfico para acceder al desarrollo de los embriones, evitándose la propagación de microorganismos en el medio de cultivo a la vez permitiendo su desarrollo hasta la etapa de blastocisto expandido.

Respecto en la etapa de mórula y blastocisto temprano (Mamani *et al.* 2017c) en condición de altura llevo a obtener 2,27% en mórula y en blastocisto el 0% a diferencia

a nuestro resultado donde se adiciono al fluido uterino alcanzando un mayor porcentaje de mórulas 12,60% y blastocistos 5,88% (Tabla 8, Figura 6 e Imagen 20). Debe plantearse en suplementar al medio de cultivo con algún componente para promover propiedades embriotróficas, ayudando a la compactación y blastulacion del desarrollo embrionario del ganado bovino.

A su vez Soto *et al.*, (2019b) registro una incidencia del 30% mórulas y 7% blastocistos cultivados al día ocho con células del oviducto, no habiendo diferencia en el resultado actual. A si mismo De los Reyes *et al.*,(2003) evaluó los porcentaje de desarrollo embrionario al comienzo del cultivo, a las 24 horas y al sexto día de incubación con la adición de células epiteliales ovidutales (BOEC), sin embargo la proporción total de blastocistos tempranos al sexto día fue significativamente superior al obtenido del 12,3%, no habiendo ninguna complicación en el tiempo de in-cubación, por ende podría incubarse hasta esta etapa pero dependería de la suplementación en la que se utilice.

El fluido uterino tiene en su composición altos niveles de albumina lo que mejora en el desarrollo embrionario del bovino protegiendo de sustancias toxicas, aportando los factores de crecimiento a ciertas hormonas, previniendo a que los embriones se adhieran al instrumental todo lo contrario al medio de cultivo no suplementado (Leese, 1988). Estas diferencias podrían tener un efecto positivo en el clivaje celular, donde esta proteína se encuentra con mayor presencia en el tracto reproductivo.

No obstante existe otro componente que recorre todo el largo del oviducto y útero denominándose a la glucosa donde es la principal fuente de energía para la división del desarrollo celular (Thompson y Peterson, 2000). En el presente estudio las referencias recabadas (Gardner y Lane, 2002) sobre la concentración de glucosa se encuentra 3,15mM en el útero, este requerimiento en base al fluido uterino suplementado permite al desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto expandido.

Los factores biológicos y técnicos que posiblemente hayan contribuido en las bajas tasas del desarrollo embrionario en ambos medios de cultivos, puede estar presente el tiempo entre colección de ovarios e incubación. Por esto, se precisa la reducción de este factor, así como el estricto control térmico tanto en el manejo de los ovarios como de los

gametos obtenidos durante todo el proceso, Así mismo existe otra causa en lo referente a la maduración incompleta o la vejez de los ovocitos cultivados.

Como señala (Peixoto, 2010) puede atribuirse a la edad del animal en este estudio se trabajó con animales beneficiadas a la camal donde se encuentran en diferentes fases del ciclo ovárico, lo cual puede tener efecto en el porcentaje de embriones producidos *in vitro*. Al cabo existen otras causas como ser; el número de ovocitos y embriones por gota de cultivo, concentración de espermatozoides, la experiencia del personal de laboratorio. Otra referencia es el caso al medio de cultivo el hecho de haber obtenido altos porcentajes de maduración *in vitro* y bajo índice de desarrollo embrionario indica que necesitan adicionar algunos componentes para soportar el incremento celular de los embriones, en el estudio presente se adiciono el fluido uterino de Llama donde se llegó alcanzar hasta blastocitos expandido, para incrementar el porcentaje se necesitaría suplementar como por ejemplo de las células somáticas. Según Block *et al.*, (2011) estimulan el crecimiento de los embriones de los mamíferos mejorando la tasa de clivaje y desarrollo embrionario.

Las diferentes investigaciones reportadas no son idénticos en nuestro estudio para la producción *in vitro* de embriones bovinos, no fue posible encontrar estudios que acontezca la suplementación del fluido uterino de Llama al medio de cultivo por lo cual se hace énfasis al oviducto.

TABLA 9. Clasificación de los embriones de bovinos producidos *in vitro* según IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones)

Medio de cultivo	Nº de cigotos cultivados	Nº de embriones de excelente calidad o buena	Nº de embriones de regular calidad	Nº de embriones de mala calidad	Nº de embriones de muertos y degenerados
Medio de Cultivo Convencional	121	12(9,92%)	24(19,83%)	30(24,79%)	55(45,55%)
Medio de Cultivo Convencional + FU de Camélido	119	18(15,12%)	30(25,21%)	33(27,73%)	38(31,93%)

Fuente: Elaboración propia

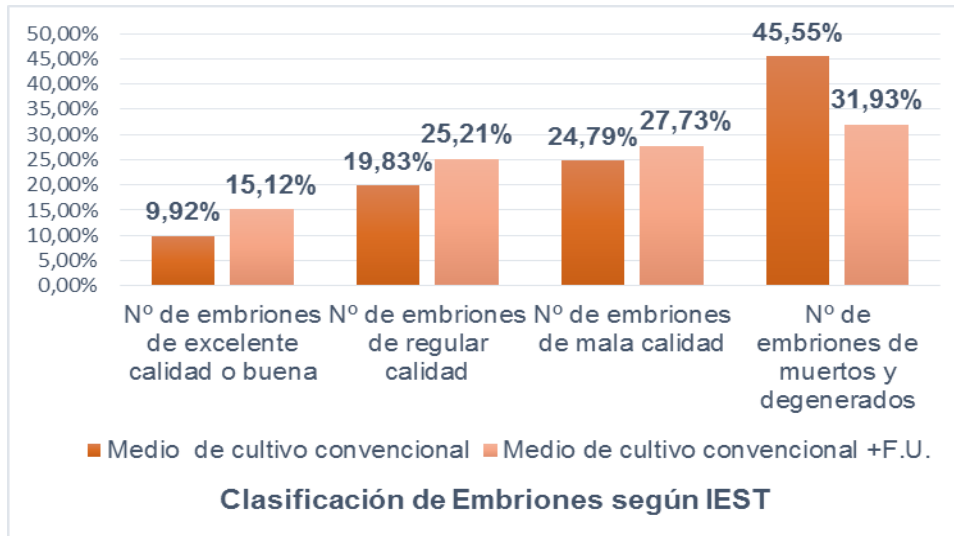


Figura 7. Clasificación sobre la calidad de embriones bovinos según (IEST)



Fuente: Elaboración propia

Imagen 21. Blastocisto expandido grado 1 para el medio de cultivo + Fluido uterino

En la imagen 21, observamos un blastocisto expandido, nótese que el diámetro aumenta hasta en un 150% y la zona pelucida se adelgaza hasta un 66%. Son embriones esféricos, simétricos con células de tamaño, color y texturas uniformes.

En la Tabla 9 y Figura 7 se muestra el resultado de la clasificación embrionaria según su calidad luego del día 8, para el medio de cultivo convencional se obtuvieron los siguientes resultados (excelente calidad de 9,91%, regular calidad 19,83%, mala calidad 24,79%, muertos y degenerados 45,55%) y para el medio de cultivo suplementado con el fluido uterino de camélido (excelente calidad 15,12%, regular calidad 25,21%, mala

calidad 27,73%, muertos y degenerados 31,93%) se establecieron de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencias de Embriones no encontrando diferencias entre ambos tratamientos, donde se observa un mayor porcentaje según su clasificación para el fluido uterino de camélido a diferencia de (Pahuara F.,2015c) obtuvo porcentajes bajos haciendo referencia al SOFaa (3,03% de embriones de excelente calidad, 8,69 de regular calidad y de 6,62% de mala calidad, las tres primeras categorías según la IETS lo constituyen los embriones transferibles. La cuarta categoría o intransferible del 81,66%.

En la clasificación de embriones producidos *in vitro* también se presentó embriones degenerados del 31,93% para el cultivo + Fluido uterino de Llama en relación al medio de cultivo 45,55% (Tabla 9, Figura 7). Estudios reportaron una incidencia del 15 a 30%, donde observaron anomalías cromosómicas, otro caso es por mixoploides, donde poseen dos o más líneas celulares, esto se daba cuando alcanzaban el 72% de 151 embriones degenerados (Holm y Henrik, 1998).

Los embriones bovinos *in vitro* poseen menos microvellosidades y un menor cantidad de uniones intercelulares ocasionado por los espacios intercelulares. Una gran presentación de detritos celulares en el espacio perivitelino y entre las células interna de la masa (Rizos *et al.*, 2002) y un gran número de gotas de lípidos, mucho más que los producidos *in vivo*, donde dificulta la visualización en el esteoscopio.

Hasler, (2001) Concluye que la calidad de los embriones ejercen un factor significativo en la tasa de preñez para embriones transferidos en fresco y congelados-descongelados. Sin embargo no todos los embriones morfológicamente normales garantizan un mejor éxito durante el desarrollo después de la transferencia embrionaria, no hay duda que los medios de cultivo embrionario afectan la calidad embrionaria, por lo que hasta la actualidad, no hay suficiente información para concluir cuál es el "mejor" de los medios o sistemas de cultivo (Millano *et al.*, 2016).

6. CONCLUSIONES

1. El porcentaje para la maduración de ovocitos *in vitro* son similares para ambos grupos, promoviendo la expansión del cumulus ophorus y el reinicio de la meiosis.
2. El porcentaje de embriones cultivados a la 48hrs post inseminación se obtuvo el 31,40% para el medio de cultivo convencional y 36,97% para el medio de cultivo más fluido uterino de Llama. No existiendo diferencia estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre ambos tratamientos, atribuyen un mayor progreso sobre el desarrollo embrionario bovino *in vitro*.
3. El porcentaje de embriones cultivados al día ocho por medio de la adición de fluido uterino de Llama al medio de cultivo, existe mejoría en el desarrollo subsiguiente hasta el estadio de blastocistos expandido del 1,68% en parte al medio de cultivo sin fluido uterino del 0%, todo lo cual apoya la hipótesis planteada en esta tesis. Existiendo diferencia estadística ($P > 0,05$).
4. Los embriones de ganado bovino se clasifico según su calidad de acuerdo a las normas IETS, tras la evaluación se efectúa durante el desarrollo embrionario una mayor competencia en el medio cultivo en ambos grupos de estudio.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Es muy valioso realizar más estudios acerca de la producción *in vitro* de embriones en las zonas altiplánicas de Bolivia para potencializar la mejora reproductiva y genética en la especie bovina, implementando la técnica por aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU) en vaca vivas.
- ✓ Es de vital realizar estudios sobre la composición del fluido uterino en la especie camélida, debido a las escasas referencias bibliográficas encontradas en esta investigación.
- ✓ Además efectuar otro trabajo comparando el fluido uterino con otros suplementos en el medio de cultivo para evaluar cuál es el más eficiente sobre el desarrollo embrionario bovino *in- vitro*.
- ✓ Poner en práctica este protocolo para la criopreservación observando la viabilidad de la división embrionaria luego de su descongelación.
- ✓ Dar continuidad a la investigación con embriones procesados mediante este protocolo en vacas receptoras para observar el porcentaje de implantación de los mismos.
- ✓ Efectuar convenios interinstitucionales con el Gobierno Autónomo municipal de El Alto y La Federación Única de Trabajadores en carne (FUTECRA) para poder realizar respectivas investigaciones dentro el área del matadero de “Los Andes” de El Alto.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abe, H., & Oikawa, T. (1991). Immunocytochemical localization of an oviductal zona pellucida glycoprotein in the oviductal epithelium of the golden hamster. *Anat. Rec.* 229: 305-314.
- Acuña Meléndez, O. (2015). Análisis transcriptómico y proteómico del oviducto y útero bovino en la fase periovulatoria. España: Universidad de Murcia.
- Ahumada Moreno, C. J. (Octubre de 2009). Efecto de diferentes factores de crecimiento en el medio de cultivo sobre el desarrollo y la calidad de embriones de bovino producidos *in vitro* en grupos (Tesis Máster). Valencia.
- Ahumada, A., Brugo, S., Mauri, A., Roblero, L., Sepúlveda, M., Medina, R., Coco, R. (2006). Manual de Procedimientos de Laboratorio de Reproducción Asistida. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Obtenido de URL:<http://es.scribd.com/doc/28374273/Fertilizacion-In-Vitro-en-Bovinos>
- Alavi-Shoushtari, S. M., Abedizadeh, R., Khaki, A., Mokarizadeh, A., & Dorostkar, K. (2014). A study on the effects of the estrous cycle on uterine fluid and blood serum immunoglobulin G (IgG) content in the cow. *Veterinary Research Forum*, 5 115-119.
- Alonso, A., & Caccia, M. (2007). Fisiología de la Reproducción de la Vaca: IRAC. p. 101.
- Anzaldúa Arce, S. R., Pérez Martínez, M., Cerbón Cervantes, M. A., & Camacho Arroyo, I. (2003). Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. México: ciencias veterinarias 9-2003-4.
- Argarañaz Martín E, Apichela Silvana A, Zampini Renato, Vencato J, Pacheco C, Ruiz Jaime, Stelletta C. (2012). Diferencias en el perfil electroforético del fluido del cuerno uterino derecho e izquierdo durante la preñez de la Alpaca. Arica: Congreso; VI Congreso Mundial Camélidos Sudamericanos.

- Arista Ruiz , M. A. (2019). Determinación y comparación de la capacidad fecundante en la producción de embriones *in vitro* de dos bovinos homocigotos de la raza aberdeen angus en la región amazonas. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza De Amazonas. (Tesis de grado). Chachapoyas- Perú. 16-43Pp.
- Austin , C., & Short , R. (1982). Procesos de la reproducción en los mamíferos. Capítulo 1. Células germinales y fertilización. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. p 15-87.
- Avery , B., & Greve , T. (1995). Impact of percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination . *Theriogenology*, 44, 871-878.
- Baker, M. A., Nixon, B., Naumovski, N., & Aitken, R. J. (2012). Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58 211-217.
- Bang , J. I., Jin, J. I., Ghanem, N., Choi, B. H., Fakruzzaman, M., & Ha, A. N. (2015). Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. *Theriogenology*: 84(4):509-523.
- Bartolomé, J. (2009). Edocrinología y fisiología de la gestación y el parto en el bovino. Conferencia dictada en el curso de Posgrado de Manejo Reproductivo en Bovinos Lecheros, organizado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNCPBA. *Taurus*, Bs. As., 11(42): 20-28.
- Benavides Idrogo, L. (2012). Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el desarrollo embrionario de Ovocitos Bovinos fecundados y cultivados *In Vitro*.
- Bespin , A., Rivero , I., & Morgado, A. (2007). Historia y uso de la inseminación artificial en al Agropecuaria "La Fundación" (I Simposio ed.). Guárico. Tecnologías apropiadas para la ganadería de los llanos de Venezuela.
- Blondin , P., Bousquet, D., Twagiramungu, H., Barnes, F., & Sirard , M. A. (2002). Manipulation of follicular developmental to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 66: 38-43.

- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and clasificación of bovine embryos. *Animal Reproduction*, 10(3), 344-348.
- Bodkne, R. R., & Harper M, J. K. (1973). Mechanism of egg transport: changes in amount of adrenergic transmitter in the genital tract of normal and hormone treated rabbits. En. *The Regulation of Mammalian Reproduction* Segal, S,J., Crozier, R, Corfman, P.A, Condiffé, P.G. editores. NIF Symposium Springfield, IL.pp. 364-37.
- Bolivar A, P., & Maldonado Estrada, J. (2008). Análisis de costos de esquemas de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia. Medellín-Colombia : Grupo de Invetigación en Ciencias Veterinarias (Centauro).
- Bourke SA, kyle CE, McEvoy TG, Young O, & Adam CL. (1995). Superovulatory responses to eCG in llamas (*Lama glama*). *Theriogenology* 44,255-268.
- Block, j., Hansen, P.J.,Loureiro, B. & Bonilla, L. (2011). Improving post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*: Actions of insulin-like growth factor- 1, colony simulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, 76 (9), 1602-1609.
- Brito , R., & Tagle , L. (2009). Fisiología de la reproducción animal: con elementos de biotecnología. Cuba: Félix Valera .
- Brogliatti, G. M., Swan, C. D., & Adams, G. P. (1995). Transvaginal ultrasoundguided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves . *Theriogenology*; 43:177 abst.
- Bruce, M., & Carlson, S. (1990). Embriología básica de PATTEN. Interamericana, McGraw-Hill. México. 173-178 Pp.
- Calado , A. M., Rocha, E., Colaco, A., & Sousa , M. (2001). Stereologic chacterization of bovine (*Bos taurus*) cumulus-oocyte complexes aspirated from small antral follicles during the diestrous phase. *Biol. Reprod.*, 65: 1383-1391.
- Camargo Maldonado, A. D., Lizarazo, C., & Ortiz, Y. (2010). Anatomía de la hembra bovina, práctica sobre paso de Sonda Foley, lavados uterinos y aspiración folicular en T.E. Grupo tecnólogos reproducción bovina.

- Camous , S., Heyman , Y., Meziou, W., & Menezo, Y. (1984). Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles . *J. Reprod. Fert.*, 72: 479-485.
- Carazas, L. K. E., (2018). Evaluación de dos medios para la maduración de ovocitos *in vitro* en ganado bovino (*Bous taurus*) en condiciones de altura.(Tesis de grado). Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Agronomía. Carrera de Ingeniería Agronómica. La Paz- Bolivia. 1-108Pp.
- Carrasco , L. C., Romar, R., Aviles , M., Gadea, J., & Coy, P. (2008). Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction*, 136 833-842.
- Catañeda , M. L. (2009). Fisiología de la reproducción bovina Desde La fecundación hasta La implantación embrionaria, Universidad La Salle, Programa de Medicina Veterinaria. (Tesis de grado). Bogota.
- Catari ,Q, M. (2018). Influencia de diferentes medios de cultivo en el desarrollo de embriones procedentes de la fertilización y maduración *In vitro* de ovocitos de alpacas. (Tesis de grado). Universidad Nacional Del Altiplano. Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia. Puno-Perú.1-74Pp.
- Chenoweth, P. (1997). Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: Youngquist: Current therapy in large animal theriogenology. Saunders, 1 Edición, pag. 217.
- Climent, S., Sarasa, M., Domínguez, L., Moniesa, P., & Terrado, J. (1998). Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Conceptos básicos y datos aplicativos. Acribia Zaragoza, España. 45-57Pp.
- Cole, H., & Cupps, P. (1984). Reproducción de los animales domésticos Tercera edición. Acribia. Zaragoza, España. 551Pp.
- Cordova , A., Perreau, C., Uzbekova, S., Ponsart, C., Locatelli, Y., & Mermillod, P. (2014). Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with

- bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.012
- Correa, J., & Zavos, P. (1996). Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology*. 46: 1225-1232.
- Coy, P. (2012). Medios de cultivo para fecundación *in vitro*: Que les falta para ser perfectos? Control de calidad externo de laboratorio de embriología clínica, 44-67Pp.
- Critser, E. S., Leibfried-Rutledge, M. L., Eyestone, W. H., Northey, D. L., & First, N. L. (1986). Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology*;25:150 abst.
- Da Costa, N. N., Bryto, K. N., Santana, P. D., Corderio, M. D., Silva, T. V., & Santos, A. X. (2016). Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. *Theriogenology*: 85(2):323-329.
- De Armas, R. (2014). Reproducción Animal. Zoot 325. Módulo#3. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Panamá. Obtenido de <https://es.slideshare.net/drdearmas/5-la-fecundacin-gestacin-parto-y-puerperio>
- De la Torre, J., López Haro, M. S., & Nieto, A. (1987). Ultrastructural and kinetic studies of uteroglobin secretion in the uterus and oviduct of the pseudopregnant rabbit. *Histochem J*.19: 572-578.
- De los Reyes, S.M., Stuardo Rosales, J., & Barros Rodríguez, C. 2003 (Aceptado el 17 de septiembre de 2003). Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario bovino *in vitro*. Universidad de Chile. Laboratorio de Reproducción Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago-Chile.
- Del Campo, M. R., Donoso, M. X., Palas, A. T., Garcia, A., & Mapletoft, R. J. (2003). The effect of days in co-culture on survival of deep frozen bovine IVF blastocysts. *Theriogenology* 1993; 39:208 abst.

- Dyce, K., Sack, W., Wensing, C., Rodriguez, E., & Camón, J. (2006). Anatomía Veterinaria, MC Graw-Hill Companies, INC. México: *Segunda Edición*.
- Ellington, J. E., Carney, E. W., Farrell, P. B., Simkin, M. E., & Foote, R. H. (1990). Bovine 1-2-cell development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol. Reprod*, 43:97.
- Enright, B., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F., Yang, X., & Boland, M. (2000). Culture of in vitro produced bovine zygotes vs in vivo: implications for early embryo development and quality . *Theriogenology* 54,659-673.
- Eyestone, W. H., Leibfried, M. L., Northey, D. L., Gilligan, B. L., & First, N. L. (1987). Culture of one-cell embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology*, 28: 1-7.
- Eyestone, W. H., & First, N. L. (1988). Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA, 53706. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Brief Communications. Vol 3.
- Eyestone, W. H., Jones, M. J., & First, N. L. (1991). Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue conditioned medium for the culture of early bovine embryos . *J. Repr. Fertil.*, 92: 59-64.
- Eyestone, W.H, J.M. Jones, & N.L.First. (1990). The use of oviduct-conditioned medium for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology*, 33: 226.
- Fernández, A. (1996). Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmoten. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela.
- Fernández, F., Hernandez, J., Gutiérrez, Y., & Cadena, E. (2007). El embrión de hámster y sus estructuras. Comunicaciones técnicas 2. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud 63p.

- Fernandéz, P. (2003). Timed artificial insemination in beef cattle using GnRh agonist, PGF2 alpha estradiol benzoate. *theriogenology* 23: 234-238.
- Fernandez-Baca S, Hansel W, Saatman R, Sumar J, & Novoa C. (1979). Differential luteolytic effects of right and left uterine horns in the alpaca . *Biol Reprod. Apr*;20(3):586-95.
- Feugang, J. M., Camargo, O., & Memili, E. (2009). Culture systems for bovine embryos . *Livestock Science* 121: 141-149.
- Feugang, J. M., Camargo-rodriguez, O., & Memili, E. (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, 121, 141-149. doi:10.1016/j.livsci.2008.06.019
- Filipiak, Y., & Larocca, C. (2010). Fertilización *in vitro* en bovinos manual teórico practico.
- Filipiak, Y., & Larocca, C. (2011). Transferecia de embriones en bovinos. Area Biotecnología de la Reproducción-Departamento de Reproducción Animal. Obtenido de http://www.fvet.edu.uy/drupal-6.16/?q=biotec_inicio
- Fonseca, P. (6 de octubre 2017). Lo que debe saber sobre el aparato reproductor de las vacas. Obtenido de <https://www.contextoganadero.com/reportaje/lo-que-debe-saber-sobre-el-aparato-reproductor-de-las-vacas#:~:text=Los%20labios%20de%20la%20vulva,marcado%20por%20el%20orificio%20uretral>
- Frank, E. N. (S.F.). Curso de Manejo Reproductivo de Camélidos Sudamericanos Domésticos. Argentina: Universidad Catolica De Cordoba; Plan Camélidos Argetinos Domesticos (PLANCAD). Obtenido de www.produccion-animal.com.ar.
- Fukui, Y. (1990). Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Rep. Dep. Vol.* 26, pp. 40-46.
- Galina , C., & Valencia , J. (2011). Reproducción de animales domésticos . 38 ed. Mexico: Limusa, S.A.

- Galli , C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, N., Ponderato, N., Colleoni, S., Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59,599-616.
- Garcia, W., Alarcon , V., & Bravo, P. W. (s.f.). Nueva Metodología de Colección de Semen e Inseminación Artificial en Alpacas y Llamas. Facultad de Medicina Veterinaria-UNSAAC- Cusco-Perú: IVITA-Marangani- Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM-Lima-Perú.
- Gardner , D. K., & Leese, H. J. (1988). The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*, 104, 423-429.
- Gardner , H. G., & Kaye, P. L. (1991). Insuline increases cell number and morphological development in mouse pre-implantation embryos in vitro . *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 79-91 .
- Gardner, D., & Lane , M. (2014). Chapter 6. Culture of viable mammalian embrions in vitro . *Principles of Cloning. Second Edition.* 63-84 .
- Gardner, D., & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*, 13, 148-159.
- Gardner, D., & Lane, M. (2002). Evolutión of sequential media. Inc J. Cibelli, R. Lanza ,K. Cambpell y W. West (Eds), *Principles of Clonig* (pp. 187-213). Elsevier Science Inc.
- Gardner, D., Lane, M., Spitzer, A., & Batt, P. (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development . *Biol. Reprod.*, 50: 390-400.
- Gasque Gómez, R. (s.f.). Reproducción Bovina. Enciclopedia Bovina. Reproducción 150; 1-10. Obtenido de www.produccion-animal.com.ar
- Ge , Z. H., & Spicer, S. S. (1988). Immunocytochemistry of ion transportmediators in the genital trat of female rodents . *Biol. Reprod.* 38: 439-452.

- González, V. (2012). Evaluación de la expansión de las células del cúmulo en la maduración *in vitro* de tres tipos morfológicos de oocitos procedentes de ovarios de vacas de matadero de la ciudad de Loja con dos medios de maduración. (Tesis de grado). Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia .
- Gordon, I. (2003). Laboratory Production of Cattle . In *Biotechnology in Agriculture Series* (2nd Editio.). Wallingford: CAB International, Wallingford.
- Greve, T.,M., S., & T.H. Hansen . (1996). Collection of oviduct fluid in heifers .*Deut. Tierarztl. Wochenschr.* 103:291-293.
- Grippe , A. A., Henault , M. A., Anderson , S. H., & Killian , G. J. (1992). Cation concentration in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *Dairy Sci.* 75: 5865.
- Hafez , E. (1996). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales (6 ed.). México: Interamericana- McGraw- Hill.
- Hafez E, F. E., & Hafez, B. (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales. (7ª ed.) México: McGraw-Hill Interamericana editores. México.
- Hansen, P. J. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle-an overview. *Therigenology;* 65: 119-125.
- Harvey , M. B., & Kaye , P. L. (1990). Insulin stimulates mitogenesis of the inner cell mass and morphological development of mouse blastocysts. *Development* 110: 963-967.
- Harvey , M. B., & Kaye, P. L. (1992). Insuline-like growth factor-1 stimulates of growth of mouse preimplantation embryos in vitro . *Reprod. Dey.* 31: 195- 199.
- Hasler , J. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Therigenology* (consultado 5 de junio de 2019); Vol 56. Page 1401-1415. Obtenido de <http://www.theriojournal.com/>
- Hernández V, A., Góngora O, A., Jiménez E, C., Rodríguez M, J., Prieto M, E., Chacón J, L., & Escobar C, F. (2008). Reproducción en la vaca Fisiología y Aplicaciones: Ed. UNAL, *Primera Edición*, p. 7-115.

- Hernandez- Ledezma, J. J., Villanueva, C., Sikes, J. D., & Kubisch, H. M. (1996). Increasing the rate of blastocyst formation and hatching *in vitro* produced bovine zygotes . *Theriogenology*, 46: 961-969.
- Herradón , P., Quintela , L., Becerra, J., Ruibal, S., & Fernández , M. (2007). Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora genética en bovinos. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15 (supl 1): 36-47.
- Herrler, A., Einspaier, R., & Beier, H. M. (1997). Binding of 1GF-1 to preimplantation rabbit embryos and their coats. *Theriogenology* 47: 1595- 1607.
- Holm , P., & Henrik, C. (1998). *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. Embryo Technology Center, Danish Institute of Agricultural Sciences .
- Holm, P., Booth, P. J., & Callesen, H. (2002). Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*-and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum- containing media. *Reproduction*, 123: 553-565.
- Holm, P., Booth, P., Schmidt, M., Greve , T., & Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* produccion system using SOF, a medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52(4): 683-700.
- Huanca W , Huanca T, Ratto M, Cordero A, Cardenas O, & Apaza N. (2004). Transferencia de embriones. Revista de la estación esperimental ILLPA Puno . Año 3 N 8. Enero-abril.
- Huanca W, Cardenas O , Olazabal C, Ratto M, & Adams GP. (2001). Efecto hormonal y empadre sobre el intervalo a la ovulación en llamas. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 1: 462-463.
- Huanca, W. (2013). Los desafíos en el manejo reproductivo de los camélidos sudamericanos. Laboratorio de Reproducción Animal- Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. Obtenido de www.alpa.org.ve/ojs.index/php

- Hunter R, H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews*, 87:244-255.
- Kan , F. w., Roux , E., St- Jacques , & Bleau , G. (1990). Demonstration by lectin-gold cytochemistry of transfer of glycoconjugates of oviductal origin to the zona pellucida of oocytes after ovulation the hamster. *Anat, Rec*, 226: 37-47.
- Khatchadourian , C., Menezo, Y., Gerard, M., & Thibault, T. (1987). Catecholamines within the rabbit oviductal fertilization time. *Hum. Reprod.* 2: 1-5Pp.
- Khurana, N. K., & Niemann, H. (2000). Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biology of Reproduction*, 62, 847-856.
- Kraublich H, Palma GA, & G Brem . (1997). Techniques of bovine embryo production and their possible consequences for breeding strategies and the future role of practitioners in embryo transfer Proceedings of 13 Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association . 115-122Pp.
- Kruip Th AM, Boni R, Wurth AA, Roelfsen MWM, & Pieterse MC. (1994). Potencial use of Ovum Pick-Up for embryo production and breeding in cattle *J of Dairy Sci* 75,2857-2879.
- Lagow , E., De Souza , M. M., & Carson, D. D. (1999). Mammalian reproductive mucins . *Hum. Reprod. Up.* 5: 280-292.
- Lane M, Gardner D. K, Hasler, M., & Hasler, J. (2003). Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology*, 60, 407-419. doi:10.1016/S0093-691X(03)00030-X.
- Lapointe , S., Ahmad , I., Buhr, M. M., & Lambert , R. D. (1996). Modulation of postthaw motility, survival calcium uptake, and fertility of bovine sperm by female genital products. *Dairy. Sci.* 79: 2155-2162.
- Lechter, R., Simmen R, C. M., Bazer, F. W., & Simmen, F. A. (1989). Insuline-Like growth factor I expression during early conceptus development in the pig. *Biol. Reprod.* 41: 1143- 1151Pp.

- Leese , H. J. (1988). The formation and function of oviduct fluid . *J Reprod. Fertil* 82,843-856.
- Leese, H. J., & Barton, A. M. (1984). Pyruvate and glucose uptake preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72, 9-13.
- León M, E., Sato S, A., Navarrete Z, M., & Cisneros S, J. (2011). Anatomía Macroscópica, Irrigación y Drenaje Venoso Del Aparato Reproductor Femenino De La Llama (*Lama glama*) (Vol. 22). Lima-Perú: Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP - Universidad Nacional de San Marcos.
- Leveille, M. C., Roberts, K. D., Chevalier , S., Chapdelaine, A., & Bleau, G. (1987). Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida . *Biol Reprod.* 36: 227-238.
- Liebfried, L., & First, N.L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci*; 48:76-86.
- Limache, C. T. (2015). Efecto de la adición del fluido folículo al medio de maduración de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones de bovino (*Bos taurus*). (Tesis de grado). Tacna- Perú: Universidad Nacional Jorge Basadre Grodmann- Tacna. 1-149Pp.
- Linder , G., & Wright, R. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4): 407-416p.
- Liu, Z., & Foote , R. (1995). Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty- five percent O₂. *Biol. Reprod.*, 53: 786-790.
- Lonergan , P., Gutierrez-Adn, A., Pintado, B., Fair , T., Ward, F., De La Fuente , J., & Boland , M. (2000). Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-1 growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 57, 146-152. doi:10.1002/1098-2795(200010)57:2<146::AID-MRD5>3.0.CO;2-2.

- Lonergan , P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., & Boland, M. P. (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 117: 159-167.
- Lonergan, P., Pedersen, H., Rizos, D., Greve, T., Thomsen, P., Fair, T., Boland, M. (2004). Effect of the postfertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 71,1096-1100.
- Lonergan, P., Rizos, D., kanka, J., Nemcova, L., Mbaye, A., kingston, M., Boland, M. (2003). Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction* 126,337-346.
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., & Ramirez, M. Á. (2017). Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryodevelopmental and quality in vitro. *Reproduction: 153(4): 461-470.*
- Malaga ,Ch.R. E., Terán Díanderas, M., & Huanca Mamani, T. (2015). Adaptación de un Protocolo de Fertilización *in vitro* para Alpacas (*Vicugna pacos*) y su evaluación a 4200 msnm en el Departamento de Puno. (Tesis de grado). Arequipa-Peru: Universidad Catolica Santa María. 41-42Pp .
- Mamani Herrera, P. M., & Valdivia Cuya, M. E. (2019). Producción de embriones pre implantacionales *in vitro* mediante ICSI y FIV en *Vicugna pacos*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.(Tesis de grado). Lima-Perú.
- Mamani, H. A. (2017). Evaluación de la Fertilización *in vitro* en ganado Bovino en condiciones de Altura.(Tesis de grado).Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Agronomia.Carrera de Ingenieria Agronomica. La Paz- Bolivia:1-94Pp.
- Marguant Le Guienne, B., Guyader Joly, C., Ponchon , S., Delalleau, N., Florin, B., Ede , P., Humblot, P. (2001). Results of *in vitro* production in a commercial ovum pick-up program. *Theriogenology*. 55(1): 441-448.

- Memili, E., & First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: A review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species . *Zygote* 8(1): 87-96.
- Millano , Z., Rosell, L., Urribarí , Y., Sánchez, R., Báez , F., & Villamediana , P. (2016). Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción *in vitro* de embriones *Bos taurus* x *indicus*. *Revista Científica*, vol. XXVI, núm. 3, pp. 173-180.
- Morales Cruz, J. L. (2017). Las biotecnologías reproductivas en bovinos como herramientas en la producción de leche. Obtenido de <https://www.ganaderia.com/destacado/Las-biotecnolog%C3%ADas-reproductivas-en-bovinos-como-herramientas-en-la-producci%C3%B3n-de-leche>
- Muci, A. C. G., Correa S, J., Cubillos G, V., & Tadich B, N. (2000). Cultivo *IN VITRO* de embriones bovinos. Universidad Austral De Chile.Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Reproducción Animal. Valdivia-Chile.
- Nancarrow , C. D., & Hill, J. L. (1995). Oviduct proteins in fertilization and early embryo development . *Reprod. Fertility Supp* 49: 3-13Pp.
- Nedambale , T., Dinnyés , A., Groen , W., Dobrinsky, J., Tian, X., & Yang, X. (2004). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification . *Theriogenology journal* (Revista en internet) ; Vol 62. Obtenido de <http://www.theriojournal.com/>.
- Nedambale T, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky J. R, Tian X. C, & Yang X. (2004). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 62, 437-449. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.10.020.
- Niemann, H., & Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in *vitro* culture conditions:implications for subsequent development. *Theriogenology* 53: 21-34.

- Noriega, S., Martínez, S., & Flores, R. (1995). Técnicas de procesamiento de embriones para la transferencia en bovinos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 27-42Pp.
- Ordoñez, E. (2005). Producción de embriones ovinos de razas de pelo y lana por medio de fertilización *in vitro*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 115Pp .
- Orsi, M., & Reischl, J. (2007). Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*. 67: 441-458.
- Pacheco, J., Vélez, V., & Pezo, D. (2015). Evaluación de la Eficiencia de la Transferencia de Embriones interespecie entre Alpacas y Llamas Obtenidos por Ovulación.(Tesis grado). Cusco-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos,Cusco,Perú :Centro de Investigación IVITA-Marangani, Facultad de Medicina Veterinaria.
- Pahuara, F. L. E. (2015). Evaluación de dos protocolos para la producción *in vitro* de embriones "bovinos" *Bos taurus* en la región de Ayacucho 2012-2013. (Tesis grado). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas.. Ayacucho-Perú. 1-96Pp.
- Palma, G., & Brem, G. (1993). Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en especie Bovina. Hemisferio Sur. Argentina, 129-142p.
- Palma, G. (2001). Biotecnología de la Reproducción. Primera Edición.
- Palma, G. (2008). Biotecnología de la Reproducción. Buenos Aires, Argentina: Rebiotec: (2da ed.) (pp. 237- 240).
- Parrish, J. J. (2014). Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 8167-73.
- Pavlok, A., Lucas-Hanhn, A., & Nienian, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod.* 31,61-67.

- Peixoto, E. (2010). The Challenges of Making a Blastocyst-Stage Embryo: Impact of Heat Stress & Technical Factors Associated with IVP Procedures. University of Tennessee, USA.
- Pérez , D. G. (2003). Diagnostico Físico en Camélidos. Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Puno (pág. 36-37).
- Perry, G. (2014). Statistics of Embryo Collection and Thansfer in Domestic Farm Animals. Retrieved March 10, 2015, from. Obtenido de <http://www.iets.org>.
- Pinyopummintr T, & BD Bavister. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free medium:effects of type of serum,timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41,1241-1249.
- Polanski , Z., & Kubiak , J. Z. (1999). Enciclopedia of Reproduction. Meiosis. USA. Vol.3. Pág. 160-167.
- Pontes , J., Silva, K., Basso, A., Rigo, A., Ferreira, C., Santos, G., Seneda, M. (2010). Lare-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from Bos taurus, Bos indicus, and indicus-taurus dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74: 1349-1355.
- Poveda I, Canha A, De la Cruz J, Morcillo E, Lopez Albors E, Soria F, Larrote R. (2017). Evaluación de Dispositivos de Recogida del Fluido Uterino en Modelo Ovino Mediante un Abordaje Minimamente Invasivo. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria Universidad de Murcia España. 1-3Pp.
- Prospero , C., & Gutierrez, E. (2011). Inseminación Artificial Como Herramienta de Mejora del Rendimiento Productivo Lechero. Lima-Perú.
- Ptak, G., Clinton , M., Barboni , B., Muzzeddu, M., Cappai, P., Tischner , M., & Loi, P. (2002). Preservation of wild european mouflon: The first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biol Reprod.* 66: 796-801.
- Quispe Villalta, B. T. (2017). Evaluación de dos métodos de adición de CO2 a una incubadora portátil en la producción de embriones *in vitro* de vacunos.(Tesis de

- grado). Puno-Perú: Universidad Nacional Del Altiplano- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.1-70Pp.
- Ratto M, Huanca W, Singh J, & Adams GP. (2006). Comparison of the effect of natural mating, LH and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas . *Anim. Reprod.Sci.* 91 (3-4): 299-306.
- Reyes, S. (1995). Fecundación *in vitro*: Una nueva reproducción. Obtenido de TECNO VET:http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D8602%2526ISID%253D428,00.html.
- Rizos , D., Fair , T., Papadopoulos, S., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 62, 320-327. doi:10.1002/mrd.10138.
- Rizos , D., Ward, F., Duffy , P., Boland, M., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocysts quality. *Mol Reprod Dev* 61,234-248.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* vs *in vivo* implications for blastocysts quality . *Mol Reprod Dev* 61,234-248.
- Roberts, G.P., J.M. Parker, & H.W. Symonds. (s.f.). Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 45:301-313.
- Rodriguez , J., & Moresco , A. (2019). Evaluación Clínica De La Función Reproductiva De Los Camélidos Del Nuevo Mundo. *Zoológica Neotropical* 4(1); 15.
- Rodriguez, N, Cognie, Y, Gonzalez,F, Poulin, N, Guignot,F, Touze, J, Mermillod, P. (2007). Rodriguez, N., CognieEffect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos . *Theriogenology*, 68, 908-913.
- Rosenkrans, C., & First, N. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro . *J. Anim. Sci.*, 72(2): 434-437.

- Sagirkaya , H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N., Parrisch, J., & Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocyte cultured in different maturation and culture conditions. *Animal reproduction science*. 101:225-240.G.
- Sato,E., Matsuo,M., & Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: Improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J Anim Sci*; 68: 1182-1187.
- Segura Portocarrero , G. T. (2016). Evaluación *in vitro* de la capacidad de maduración y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos extraídos de folículos de tres diámetros diferentes .
- SENAMHI. (2016). Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. Dirección Regional de Batallas. Estado plurinacional de Bolivia .
- Senatore , E. J., Xu, M., Suárez , G., Gong, T., Lin , A., Bella , J.,Wu , F. D. (2010). Improved *in vitro* development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos . *Theriogenology*. 74: 1643-1651.
- Somfai , T., Inaba, Y., Watana, S., Masaya, G., & Nagai, T. (2012). Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes . *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 743-752.
- Soto Martínez, Y., Casas Hernández, E., Betancourt-Rule, J. M., & Fernández-Reyes, F. (enero-abril de 2019). Desarrollo embrionario de bovino *in vitro* cocultivado con células oviductales y del cumulus oophorus. *Revista de Salud Animal*, 41(1), 1-8. Obtenido de <http://opn.to/a/mgHn7>.
- Spiliots, B. (2003). Growth hormone insufficiency and its impact on ovarian function. *Ann N Y Acad Sci*; 997:77-84.
- Stanke D. F., Sikes J. D., Deyoung D. W., & Tumbleso. Me . (1974). Proteins and amino-acids in bovine oviducal fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, 38 493-496.
- Staub, C., & Johnson, L. (2008). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 1-9.

- StetTeenhagen , W. P., Pineda , M. H., & Gnther, O. J. (1972). Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares . *Am. J. Vet. Res* 33: 2391- 2398.
- Stringfellow, D. A., & Givens, M. D. (2010). *Manual of the international Embryo Transfer Society (IETS)* (4th ed.). IL, USA: IETS.
- Susaño, M. R. (2017). Evaluación de la viabilidad de embriones producidos *in vitro* de ganado bovino al proceso de congelación y vitrificación en condiciones de altura. (Tesis de grado). Universidad Mayor de San Andres.Facultad de Agronomia.Carrera de Ingenieria Agronomica. La Paz-Bolivia. 1-80Pp.
- Susuki T, Sumatri C, Khan NHA, Murakami M, & S Saha. (1997). Development of a simple portable carbon dioxide incubator for production of bovine ivf embryos *Theriogenology* 47,285.
- Suzuki, T., Sumantri, C., Khan , N., Murakaml , & Saha, S. (1999). Development of a simple, portable carbón dioxide incubator for *in vitro* producción of bovine embryos. (Vol. 53). *Anim. Reprod. Sci.*
- Swanson W. (2006). Aplicacion of assisted reproduction for population management in felids:The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*. 66:49-58.
- Swanson, W. (2006). Aplicacion of assisted reproduction for population management in felids: The potencial and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*. 66: 49-58.
- 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.
- Telford , N. A., Watson, A. J., & Schultz, G. A. (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species . *Mol. Reprod.*, 26: 90-100.
- Tervit , H., Whittingham, D., & Rowson, L. (1972). Successful culture *in vitro* sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 30:493-7.

- Thompson, J. G., & Peterson, A. J. (2000). Bovine embryo culture *in vitro*: new developments and post-transfer consequences . *Human Reproduction*. 15, Suppl (5), 59-67.
- Tovío,N, Duica,A, & Grajales,H. (2008). Desarrollo embrionario y estrategias antiluteolíticas hormonales en programas hormonales en programas de transplante de embriones bovinos . *Rev.MVZ Córdoba*, 13(1), 1240-1251.
- Urrego , R., Tarazona, A., Oliveira Ángel, M., & Camargo , O. (2018). Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev. Col. Cien. Pec.*, 21(3): 398-405.
- Vaughan, J. (2006). Ovarian synchronization and induction of ovulation of ovulation in llamas and alpacas. In: Youngquist RS, Threlfall WR, eds. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, 2nd . St Louis, MO: *Saunders Elsevier*; 884-889.
- Wang S, Y Liu, GR Holyoak, & TD Bunch. (1997). The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre-and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media . *Anim Reprod Sci* 48,37-45.
- Wani, N. (2002). *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Res*. 44: 89-95.
- Ward, J. P., Watson , P. F., & Noakes, D. E. (1989). Chronic in situ monitoring of the free calcium ion concentration in the uterine tubes and horns of the sheep . *Comp. Biochem Physiol. (A)*. 94: 765-769.
- Watanabe , Y. F., Dayan, A., Meirelles , F. V., & Watanabe, M. R. (2001). Pre and post implantation development of IVP bovine embryos. *Theriogenology*, 55(1): 441-448.
- Watiaux, M. (2004). (En línea). Consultado 22 de octubre 2019. "La Función Reproductiva del Ganado Lechero" Aspectos Generales del Tracto Reproductivo. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison-Estados Unidos de América. Obtenido de nydairyadmin.cce.cornell.edu/uploads/doc_102.pdf.

- Watson, A. J. (1992). The cell biology of blastocyst development . Mol. Reprod. Dev., 33(4): 492-504.
- Wood , T., & Wildt, D. (1997). Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. J Reprod Fertil. 110: 355-360.
- Wright , R. W., & Bondoli , K. R. (1981). Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals . J. Anim. Sel, 53: 702-729.
- Xu , K. P., Greve , T., Callensen, H., & Hyttel, P. (1987). Pregnancy result from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro* . J. Repr. Fertil., 81; 501-504.
- Yadav , B. R., King , W. A., & Betteridge, K. J. (1993). Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. Molecular Reproduction and Development 36, 434-439. doi:10.1002/mrd.1080360405.
- Yanguma , C. (2009). "Aparato reproductivo de la hembra bovina".
- Zampini, R., Apichela, S., Sari, L., Angiono , G., Lombardo, D., Miceli, D., & Argañaraz, M. (2017). Segment Specific Expression of MMP/TIMP in the Oviduct of Llama (*Lama glama*) and Gelatinolytic Activity in the Oviductal fluid. Internacional journal of Morphology 35(2), 615-623. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000200038>.
- Zhang, Y. (2017). Uterine fluid in pregnancy:a biological and clinical Outlook. Trends in Molecular Medicine 23: 604-614.

ANEXOS

Anexo 1: Proteínas más abundantes del fluido oviductal de la especie bovina (FOB)

Símbolo	Nombre	Acceso	Vol(%)
ALB	Albumina sérica	PO2769	21.131538
ENO1	Alfa-enolasa	O9XSJ4	1.729888
ENO3	Beta-enolasa	O3ZCO9	1.729888
TPPP3	El miembro 3 de la familia de proteínas promotoras de la polimerización de tubulina	O3ZCC8	1.534906
HSPA5	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa	OOVX2	1.431596
HSP90B1	Endoplasmina	O95M18	1.181098
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P10096	0.905705
ACTG1	Actina citoplasmática	P63258	0.883473
ACTG2	músculo liso gamma-entérico	O5E9B5	0.883473
TUBB5	Cadena tubulina beta-5	O2KJDO	0.882556
PDIA3	Proteína disulfuro-isomerasa A3	P38657	0.715439
EPHX2	Epóxido hidrolasa	O17QK4	0.639033
CALR	Calreticulina	P52193	0.629642
TPI1	Triosa fosfato isomerasa	O5E956	0.567540
PEBP1	proteína 1 de unión a fosfatidiletanolamina	P13696	0.507784
PDIA6	Proteína disulfuro-isomerasa A6 precursor	A6QNLS	0.447726
STIP1	Fosfoproteína inducida por estrés 1	O3ZBZ8	0.435986
P4HB	Proteína disulfuro isomerasa	PO5307	0.415748

Anexo 2: Proteínas más abundantes de fluido uterino de la especie bovina (FUB)

Símbolo	Nombre	Acceso	Vol (%)
ALB	Albumina sérica	PO2769	42.840677
AKR1B1	Aldosa reductasa	P16116	1.272226
ACTG1	Actina citoplasmática 2	P63258	0.947259
ACTG2	músculo liso gamma-entérico	O5E9B5	0.947259
TF	Serotransferrina precursor	Q29443	0.789324
TF	Serotransferrina precursor	Q29443	0.700539
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa (NADP) citoplasmático	Q9XSG3	0.649181
TF	Serotransferrina precursor	Q29443	0.630819
TF	Serotransferrina precursor	Q29443	0.625038
ALB	Albumina sérica	PO2769	0.567432
ALDOA	Fructosa-bifosfato aldolasa A	A6QLL8	0.504118
ALDOC	Fructosa-bifosfato aldolasa C	Q3ZBY4	0.504118
ENO1	Alfa-enolasa	Q9XSJ4	0.438016
ENO3	Beta-enolasa	Q3ZCO9	0.438016
ALB	Albumina sérica	PO2769	0.407473
TIP1	triosa fosfato isomerasa	Q5E956	0.364798
PNP	Purina nucleósido fosforilasa	P55859	0.363296
CKB	La creatina quinasa de tipo cerebral	Q5EA61	0.315712

Anexo 3. Limpieza profunda de laboratorio



Fuente: Elaboración propia

Anexo 4. Equipos y materiales de laboratorio



Fuente: Elaboración propia

Anexo 5. Materiales para la colecta del fluido uterino de Llama



Fuente: Elaboración propia

Anexo 6. Construcción de la tarima



Fuente: Elaboración propia

Anexo 7. Camélido transportado al brete de bovino (adaptado)



Fuente: Elaboración propia

Anexo 8. Extracción del tranquilizante (Acepromacina) 1ml



Fuente: Elaboración propia

Anexo 9. Procesamiento del fluido uterino de Llama



Fuente: Elaboración propia

Anexo 10. Toma de muestra de ovarios en predios del matadero los Andes- El Alto



Fuente: Elaboración propia

Anexo 11. Extracción, lavado y secado del ovario (Libre de impurezas)



Fuente: Elaboración propia

Anexo 12. Aspiración del fluido folicular



Fuente: Elaboración propia

Anexo 13. Medios de cultivo comercial para la Producción de Embriones *in vitro*



Fuente: Elaboración propia

Anexo 14. Cambio de medio de cultivo a las 48hrs



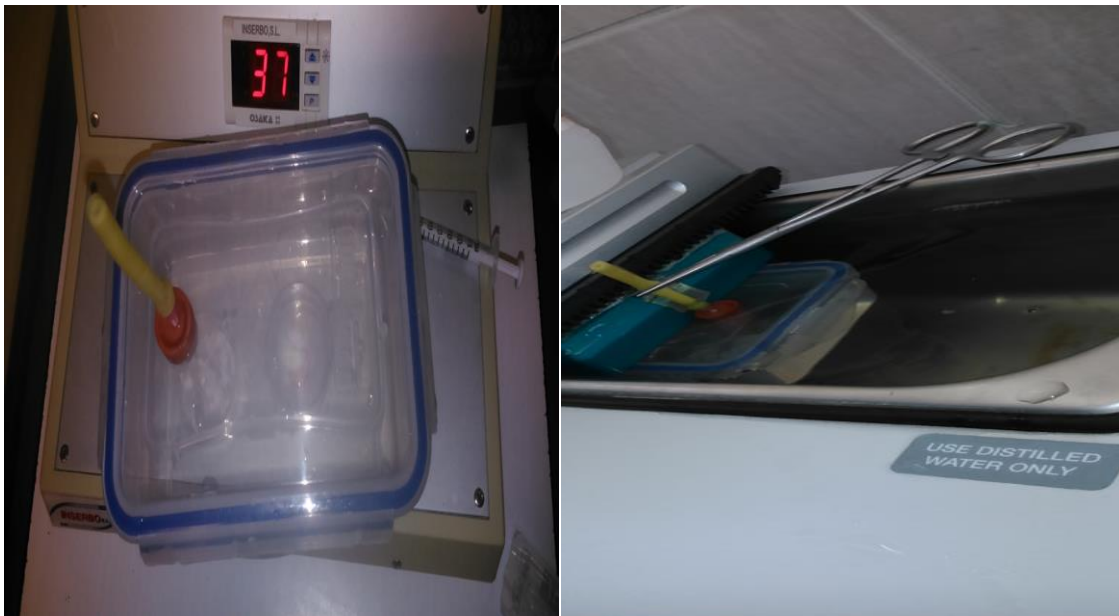
Fuente: Elaboración propia

Anexo 15. Pesaje del efervescente 0,24g



Fuente: Elaboración propia

Anexo 16. Adaptación de una incubadora convencional



Fuente: Elaboración propia

Anexo 17. Verificación del Ph de los medios (PIV)



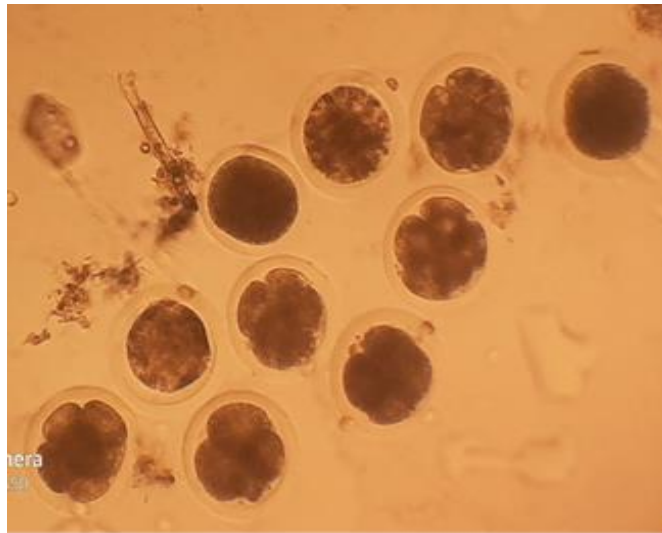
Fuente: Elaboración propia

Anexo 18. Vortización de cigotos (desnudación del comulus ophurus)



Fuente: Elaboración propia

Anexo 19. Visto por esteroscopio a 10x : Día 3 (4-8 células)



Fuente: Elaboración propia

Anexo 20. Certificado de trabajo de campo del Matadero Municipal Los Andes El- Alto

GOBIERNO AUTÓNOMO MUNICIPAL DE EL ALTO
SECRETARÍA MUNICIPAL DE DESARROLLO ECONÓMICO
DIRECCIÓN DE SERVICIOS MUNICIPALES E INICIATIVAS ECONÓMICAS

CERTIFICACIÓN
DE TRABAJO DE CAMPO (TESIS DE GRADO)
La administración del Matadero
Municipal "Los Andes"

CERTIFICA QUE:

LA UNIV. MARISABEL NINA VERA

Con C.I. 9103382 L.P. y Matricula: 1680477; realizo Trabajo de campo realizando la toma de muestras de ovarios en hembras faenadas de especie bovino, en el Matadero Municipal "Los Andes" de la tesis que lleva por título: "EVALUACIÓN DEL FLUIDO UTERINO DE LLAMA (*lama glama*) EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL GANADO BOVINO PARA CULTIVOS *IN VITRO*"; el tiempo de 3 meses, (septiembre, octubre y noviembre del 2019), con repetición de muestreo (enero, febrero y marzo de la gestión 2021).

Es cuanto informo en honor a la verdad para fines consiguientes.




Dra. M. V. E. Ruth G. Quispe Tola
ADMINISTRADORA DEL MATADERO
MUNICIPAL DE LOS ANDES

LA PAZ - EL ALTO, 28 DE JUNIO DE 2021