

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DEL CULTIVO IN VITRO DE OOCITOS BOVINOS (*Bos taurus* L.)
UTILIZANDO LA TÉCNICA HANGING DROP SOBRE EL DESARROLLO
EMBRIONARIO**

KARINA ANDREA EGG ARMERO

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado(a) en Biología

Asesor: Mg. Hugo Mauricio Gonzáles Molfino

Lima, Perú

2020

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DEL CULTIVO IN VITRO DE OOCITOS BOVINOS (*Bos taurus* L.)
UTILIZANDO LA TÉCNICA HANGING DROP SOBRE EL DESARROLLO
EMBRIONARIO**

KARINA ANDREA EGG ARMERO

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado(a) en Biología

Asesor: Mg. Hugo Mauricio Gonzáles Molfino

Lima, Perú

2020

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* DE OOCITOS BOVINOS (*Bos taurus* L.)
UTILIZANDO LA TÉCNICA HANGING DROP SOBRE EL DESARROLLO
EMBRIONARIO**

KARINA ANDREA EGG ARMERO

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y ASESOR.

PRESIDENTE: Dr. Hugo Gonzales Figueroa

SECRETARIO: Lic. Miguel Dávila Robles

VOCAL: Lic. Andrés Chavieri Salazar

ASESOR(A): Mg. Hugo Mauricio Gonzáles Molfino

INDICE

	Pág.
ÍNDICE	5
INDICE DE ANEXOS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Planteamiento del problema	11
1.2. Justificación de la investigación	12
1.3. Objetivo general	13
1.4. Objetivos específicos	13
II. MARCO TEÓRICO	14
2.1. Fisiología reproductiva de la hembra	14
2.2. Ciclo estral	14
2.3. Folículoogénesis	15
2.4. Maduración <i>in vitro</i>	16
2.5. Fecundación <i>in vitro</i>	16
2.6. Producción de embriones <i>in vitro</i>	17
III. ANTECEDENTES	18
IV. HIPÓTESIS	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Lugar de ejecución	21
5.2. Tipo y diseño de investigación	21
5.3. Variables	21
5.4. Operacionalización de las variables	21
5.5. Muestreo	22
5.6. Procedimiento	22
5.7. Análisis de datos	25
V. RESULTADOS	26
VI. DISCUSIÓN	32
VII. CONCLUSIONES	34
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
IX. ANEXOS	36

INDICE DE ANEXOS

Figura 5. Observación de cinco categorías de clasificación de ovocitos bovinos	40
Figura 6. Técnicas de cultivo Hanging Drop y cultivo convencional	41
Figura 7. Proceso incubación con mezcla de gases de embriones en bolsa hermética	42

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el cultivo in vitro de ovocitos bovinos (*Bos taurus* L.) mediante la técnica Hanging Drop sobre el desarrollo embrionario. Se utilizaron ovarios de vacas Holstein, obtenidos de un matadero y transportados dentro de las 4 horas posteriores al sacrificio. El complejo de cúmulos de ovocitos se obtuvo por aspiración de pequeños folículos antrales (2-8 mm) con aguja de calibre 18. Después de 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se diluyó el sedimento en TCM199 con piruvato de sodio 0,2 mM, NaHCO₃ 4,2 mM, HEPES 2,64 g / l, gentamicina 50 mg / ml para la selección. Se seleccionaron ovocitos con células de cúmulos compactos multicapa y citoplasma granulado uniformemente. Los AOC se dividieron en dos grupos: para el grupo 1, se colocaron 10 AOC por 40 ul de gotas de medio en placas de Petri y se cubrieron con aceite mineral. El grupo 2 utilizó la técnica Hanging Drop, que consistió en colocar 10 AOC en gotas suspendidas de medio de 40 ul en placa petri. Para ambos grupos, se utilizó TCM199 con 20 mg / ml de FSH, 1 mg / ml de 17b-estradiol, FBS al 10%, 50 mg / ml de gentamicina, 2,2 mg / ml de piruvato sódico, 0,22 g / l de NaHCO₃, incubados a 38,5 ° C, 5% CO₂, 99% de humedad durante 24 horas. Se utilizaron pajitas de semen congelado de un toro certificado. El medio de fertilización fue HTF® con 0,01 mg / ml de heparina sódica, cafeína 20 mM, 6 mg / ml de BSA. El espermatozoide descongelado se lavó con medio de fertilización a 500 g durante 5 minutos. La concentración final se ajustó a 1 x 10⁶ espermatozoides / ml. Se utilizaron alícuotas de 15 ul de suspensión de espermatozoides por pocillo, incubando a 38,5 ° C, 5% de CO₂, 99% de humedad durante 18 horas. Después de 18 horas, los ovocitos se lavaron con HTF-HEPES® y los cúmulos restantes y los espermatozoides se eliminaron mediante pipeteo mecánico hasta que los ovocitos se desnudaron. Los presuntos cigotos se colocaron en G-TL® y las placas de cultivo se colocaron en bolsas herméticas y se mantuvieron en la mezcla: 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ a 38.5 ° C y 99% de humedad por 7 días. La tasa de división del grupo 2 fue de 65.56%, mientras que para el grupo 1 fue de 60.18%. Se obtuvo un porcentaje promedio de mórulas y blastocistos del 59.43% y 41.93% para el grupo 2 frente al 56.67% y 36.58% del grupo 1. Hubo diferencia en la tasa de división, en la obtención de mórulas y blastocistos con grupo 2 con respecto al grupo 1. Sin embargo, no existe una diferencia significativa en los patrones de desarrollo embrionario con el tratamiento Hanging Drop incluso cuando hay una diferencia porcentual (p <0.05).

Palabras clave: hanging drop, maduración in vitro, bovinos

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the *in vitro* culture of bovine oocytes (*Bos taurus* L.) using the Hanging Drop technique on embryonic development. Holstein cow's ovaries were used, obtained from a slaughterhouse and transported within 4hrs of slaughter. The oocyte cumulus complex was obtained by aspiration of small antral follicles (2-8mm) with 18-gauge needle. After 15 min, the supernatant was discarded and sediment diluted in TCM199 with 0.2mM Sodium Pyruvate, 4.2mM NaHCO₃, 2.64g/L HEPES, 50mg/ml gentamicin for selection. Oocytes with multilayered compact cumulus cells and evenly granulated cytoplasm were selected. The COCs were divided into two groups: for group 1, 10 COCs were placed per 40ul drops of medium in petri dishes and covered by mineral oil. Group 2 used the Hanging Drop technique, consisted of placing 10 COCs in suspended drops of 40ul medium in petri dish. For both groups, TCM199 with 20mg/ml FSH, 1mg/ml 17 β -estradiol, 10% FBS, 50mg/ml gentamicin, 2.2mg/ml sodium pyruvate, 0.22g/l NaHCO₃ was used, incubated at 38.5°C, 5% CO₂, 99% humidity for 24hrs. Straws of frozen semen from a bull certified were used. Fertilization medium was HTF® with 0.01mg/ml sodium heparin, 20mM caffeine, 6mg/ml BSA. The thawed sperm was washed with fertilization medium at 500g for 5 minutes. The final concentration was adjusted to 1x10⁶ sperm/ml. Aliquots of 15ul sperm suspension were used per well, incubating at 38.5°C, 5% CO₂, 99% humidity for 18 hrs. After 18hrs oocytes were washed with HTF-HEPES® and remaining cumulus and sperm cells removed by mechanical pipetting until oocytes were denuded. The presumptive zygotes were placed in G-TL® and culture plates were placed in hermetic bags and kept in the mixture: 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ at 38.5°C and 99% humidity for 7 days. The division rate of group 2 was 65.46%, while for group 1 it was 60.18%. An average percentage of morulas and blastocysts of 59.43% and 41.93% was obtained for the group 2 compared to 56.67% and 36.58% of group 1. There was a difference in the rate of division, in obtaining morulas, and blastocysts with group 2 with respect to group 1. However, there is no significant difference in embryonic development patterns with Hanging Drop treatment even when there is a percentage difference (p <0.05).

Keywords: hanging drop, in vitro maturation, bovines

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería en el Perú representa una industria importante dentro del sector agropecuario. Actualmente existen programas de mejoramiento genético promovidos por el Estado, sin embargo, el crecimiento sigue siendo moderado, probablemente porque todavía no existe una capacitación adecuada para afrontar los requerimientos que exige el uso de biotecnologías reproductivas.

El empleo de biotecnologías reproductivas se muestra como apoyo a la producción de ganado bovino; dentro de las que se incluyen la inseminación artificial, fecundación *in vitro*, maduración *in vitro* y producción de embriones *in vitro*.

La producción de embriones *in vitro* es una tecnología que consiste principalmente de 4 etapas: obtención de ovocitos, ya sea por aspiración ovárica de animales vivos o mediante colecta de ovarios de animales sacrificados en el matadero; maduración *in vitro*, en la que los ovocitos seleccionados reanudan la meiosis hasta alcanzar la metafase II; fecundación *in vitro*, en la que se realiza una co-incubación de espermatozoides con los ovocitos madurados; y el cultivo embrionario, en el que los ovocitos fecundados deben ser acondicionados en un medio de cultivo adecuado para su posterior desarrollo hasta un periodo de 7 días aproximadamente hasta alcanzar el estadio de blastocisto. Esta tecnología tiene aplicaciones para la investigación básica ya que permite producir embriones a un bajo costo a partir de ovarios de animales sacrificados para ser utilizados como modelo traslacional y de forma comercial ya que permite producir una mayor cantidad de embriones con una sola dosis de semen, pero sobre todo sirve como base para el desarrollo de otras técnicas como clonación o transgénesis.

En la búsqueda por establecer modelos de cultivo capaces de imitar el entorno en el que se desarrollan los folículos *in vivo*, y tomado en cuenta la importancia del arreglo espacial de las células, se vienen desarrollando cultivos tridimensionales en el área de reproducción como los sistemas de encapsulación con hidrogeles de alginato y cultivos de microgotas en suspensión. A estos se le suma la técnica Hanging Drop que consiste en colocar gotas con medio en la tapa de una placa Petri estéril la cual será invertida para que estas gotas queden suspendidas, y colocando PBS en la base de la placa para evitar su evaporación. Esta técnica tiene ciertas ventajas ya que permite trabajar con volúmenes pequeños, es fácil de replicar y

no requiere de mucho equipamiento, pero sobre todo podría permitir una adecuada comunicación entre el ovocito y las células que lo rodean lo que constituye un factor importante dentro del proceso de maduración.

La siguiente investigación tiene como objetivo evaluar el cultivo *in vitro* de ovocitos bovinos (*Bos taurus* L) utilizando la técnica Hanging Drop sobre el desarrollo embrionario.

I.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ganadería bovina en el Perú representa un sector importante dentro de la producción agropecuaria. Según MINAGRI se estima que, de un total de 1'764,660 hogares rurales, alrededor de un 30% cría vacunos, los cuales se concentran principalmente en la Sierra. A pesar de que el estado cuenta con programas de mejoramiento genético vigentes el crecimiento sigue siendo moderado, probablemente porque todavía no existe una capacitación adecuada para afrontar los requerimientos que exige el uso de técnicas de biotecnologías reproductivas. En cuanto a la producción de carne, el rendimiento se mantiene prácticamente desde el 2001, de 283 kg/unidad en el año 2001 a 281 kg/unidad en el 2015. A nivel regional, es liderado por Cajamarca con el mayor volumen en peso vivo de bovinos con 62 mil toneladas en el año 2015, seguido por Lima, Puno y Huánuco con una producción de 40 mil toneladas. La producción de leche fue de 1,9 millones de toneladas para el año 2015; sin embargo, parece que todavía no satisface la demanda interna ya que la industria importa 19' 715 toneladas de leche en polvo.

En la práctica común se utiliza ganado criollo que presenta un bajo rendimiento, la reproducción del ganado se da por monta natural o en menor medida mediante inseminación artificial, sin embargo, estas técnicas no garantizan una mejor calidad genética.

1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La producción de embriones *in vitro* se presenta como una alternativa promisoría para mejorar la producción de ganado bovino en el Perú. Este tipo de biotecnología reproductiva tiene una serie de aplicaciones tanto para la investigación básica como de tipo comercial, así como base para el desarrollo y/o aplicación de otras técnicas de importancia como la clonación o transgénesis.

Dentro de la investigación básica permite producir embriones con bajo costo a partir de ovarios de animales sacrificados para consumo los cuales son utilizados como modelo traslacional.

Como aplicación comercial, brinda la posibilidad de producir una mayor cantidad de embriones con una sola dosis de semen lo que facilita el aprovechamiento de semen de alto valor; así como obtener descendientes de vacas de elevada calidad genética que debían ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas.

Desde el punto de vista de investigación el presente trabajo busca aportar con una técnica que permita una mejor producción de embriones y así promover el desarrollo de la ganadería en el Perú.

1.3 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el cultivo *in vitro* ovocitos bovinos (*Bos taurus* L) utilizando la técnica Hanging Drop sobre el desarrollo embrionario

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la tasa de división de los ovocitos fecundados mediante la técnica Hanging Drop
- Determinar el porcentaje de mórulas obtenidas por la técnica Hanging Drop
- Obtener el porcentaje de blastocistos mediante la técnica Hanging Drop

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Fisiología reproductiva de la hembra

La llegada de la pubertad en vacas es una etapa de transición en la que se pasa de un estado anovulatorio a uno con ovulaciones regulares. Esta etapa está mediada principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis, el cual es sensible al efecto de retroalimentación negativa producido por bajas concentraciones de estrógenos. Conforme va desarrollándose el sistema neuroendocrino, el hipotálamo va perdiendo gradualmente esta sensibilidad al efecto de retroalimentación negativa por parte del estradiol, lo que permite la secreción de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) y posteriormente la liberación de la Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Folículo Estimulante (FSH) (Moran *et al.* 1989).

El feto en crecimiento secreta gonadotropinas en los primeros 7 meses de gestación, para luego producirse una disminución gracias al estímulo de su Sistema Nervioso Central (SNC) (Levasseur. M, 1979). Después del nacimiento los niveles de LH en sangre alcanzan un máximo alrededor de los 3 meses de edad para luego disminuir lentamente antes de volver a elevarse y culminar en ovulación (Schams *et al.* 1981). Esta elevación de LH estimula el desarrollo folicular lo que resulta en la síntesis de estradiol.

Existe un periodo peripuberal alrededor de 50 días previos a la pubertad, en el que el estradiol continúa ejerciendo una retroalimentación negativa después de la cual esta sensibilidad disminuye gradualmente. Como resultado el estradiol se vuelve inefectivo en suprimir la secreción de LH por lo tanto se produce un pico de LH ovulatorio (Kinder. J; Day. W; Kittok. R, 1987).

2.2 Ciclo estral

El control del ciclo estral involucra una serie de señales que permiten la liberación de gonadotropinas que se requieren para los procesos de desarrollo folicular, esteroidogénesis y ovulación. El mecanismo primario que regula la síntesis y liberación de gonadotropinas dentro del portal del hipotálamo-adenohipófisis se da principalmente con la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH). Existen factores internos y externos que son percibidos a nivel del sistema nervioso central que controlan la liberación de GnRH, la cual da lugar a la síntesis y liberación de las hormonas LH y FSH. Estas dos hormonas viajan

por el torrente sanguíneo hasta el ovario para estimular el desarrollo folicular y maduración, ovulación y síntesis de esteroides.

El ciclo estral tiene una duración aproximada de 21 días, en el que se considera el día 0 como el día en que la hembra exhibe el estro o celo. El estro es inducido por una elevación en las concentraciones de estradiol que se producen al aumentar la esteroidogénesis folicular durante el desarrollo del folículo dominante (Hansel & Convey, 1983). Este aumento de estradiol genera un estímulo en el SNC para GnRH, lo que a su vez produce un pico preovulatorio de LH (Rahe *et al.* 1980). La ovulación es inducida aproximadamente 30 horas después del comienzo del estro y es seguido por una disminución abrupta en las concentraciones de estradiol.

2.3 Foliculogénesis

La población de folículos primordiales, originados en la vida fetal, inician su crecimiento y diferenciación mediante el proceso de foliculogénesis. El folículo primordial crece, la capa de células de la granulosa que lo rodean se transforma de aplanada a cuboidal para luego proliferar y formar varias capas, la capa de células de la teca se diferencia en dos capas originando la teca interna y externa y posteriormente el ovocito desarrolla la zona pelúcida (Hansel & Convey, 1983). El desarrollo folicular hasta el estado antral puede ocurrir independientemente de la acción de las gonadotropinas (Dempsey, 1937), pero el porcentaje de folículos pre-antrales en crecimiento es acelerado por las gonadotropinas. Se pueden encontrar un gran número de folículos de todos los tamaños a lo largo del ciclo estral, es decir, existe un flujo dinámico de folículos en crecimiento, que regresionan o son reemplazados por otros de mayor tamaño durante el ciclo (Matton, 1981).

Después de la regresión luteal, están presentes folículos sensibles y no sensibles a estrógenos, sin embargo, para el momento que ocurre el pico de LH, sólo los folículos sensibles quedarán activos. Los folículos ovulatorios crecerán, y aumentarán el número de receptores de LH en la teca y células de la granulosa. Estos folículos se vuelven más sensibles a la LH y aumentaran su capacidad de secretar estradiol (Hansel & Convey, 1983).

2.4 Maduración *in vitro*

Un ovocito se considera competente cuando posee la capacidad de madurar, ser fertilizado y de llevar a cabo una descendencia normal y saludable (Duranthon & Renard 2001). Para esto debe almacenar ARN y proteínas que serán utilizadas posteriormente para reanudar y completar su maduración, apoyar la fertilización e iniciar el desarrollo embrionario (Brevini *et al.* 2007). La maduración de ovocitos se produce en respuesta al aumento preovulatorio de LH, y abarca un conjunto de cambios nucleares y citoplásmicos (Fair *et al.* 2001). Existe una cooperación entre el ovocito y las células somáticas que rodean al folículo que permite el intercambio de sustratos para el desarrollo del ovocito en crecimiento, la cual está mediada por mecanismos de comunicación célula-célula denominado uniones GAP (Norris *et al.* 2009).

Un criterio de selección usado para la maduración *in vitro* es la morfología del complejo cúmulo-ovocito, es decir, su grado de compactación y grosor, así como las características del citoplasma (Blondin & Sirard, 1995). La expansión de células de cúmulo es considerada un marcador de maduración ovocitaria la cual es inducida por estimulación de gonadotropinas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Se han empleado una serie de medios de maduración para cultivar ovocitos bovinos sin embargo en la mayoría de los laboratorios se utiliza medio TCM-199, ya que es considerado un medio completo enriquecido con 200 componentes que, a su vez, es suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), piruvato, FSH, estradiol y antibióticos (Sirard *et al.* 1988).

2.5 Fecundación *in vitro*

Una vez que los ovocitos han madurado es necesario que sean expuestos a espermatozoides que estén capacitados previamente. Para que un espermatozoide se considere capacitado tienen que ocurrir modificaciones bioquímicas que le permita producir una reacción acrosomal ante la exposición a la zona pelúcida y/o células de cúmulo (Florman & First, 1988).

Al realizar lavados oviductales en vacas encontraron altas concentraciones de glicosaminoglicanos (GAG) (Lee & Ax, 1984). La heparina es el GAG más utilizado debido a su capacidad de inducir la capacitación espermática *in vitro*. Para que esto suceda la

heparina debe unirse al espermatozoide a través de proteínas en su membrana (Parrish. J; Susko. J; First. N, 1998b) además produce cambios en el pH intracelular, calcio intracelular y niveles de adenosin 3'5'-monofosfato cíclico (AMPc).

Se han incluido diferentes suplementos para mejorar las tasas de fecundación, por ejemplo, inhibidores de fosfodiesterasas como la cafeína, usada comúnmente para incrementar los niveles de AMPc espermático. Se ha reportado un alto porcentaje de penetración de espermatozoides potenciado por un efecto sinérgico entre un alto nivel de cafeína (5mM) y heparina (Niwa *et al.* 1991). El uso de semen congelado-descongelado fue fundamental para la producción repetible de embriones producidos *in vitro* (Parrish *et al.* 1986).

2.6 Producción de embriones *in vitro*

La etapa de cultivo post-fecundación requiere de un ambiente adecuado para el desarrollo del embrión ya que para pasar de cigoto a blastocisto tiene que pasar por una serie de eventos que incluyen la primera división por escisión, la activación del genoma embrionario en el estadio de 8-16 células, la compactación de la mórula aproximadamente al día 5 y la formación del blastocisto a los días 7-8 en la que se evidencia una diferenciación de dos tipos celulares, es decir, las células del trofoblasto y la masa celular interna.

A lo largo de los años se han utilizado diferentes medios para cultivar embriones cuya composición consiste en soluciones equilibradas compuestas por sales y carbohidratos como el Charles Rosenkrans 1 (CR1), Medio Simple de Optimización de Potasio (KSOM) y Medio Sintético Oviductal (SOF).

Existen discrepancias en cuanto al uso de proteínas séricas en el medio de cultivo específicamente al suero fetal bovino (SFB) ya que contiene factores de crecimiento que podrían aportar al cultivo, sin embargo, es la naturaleza indefinida del mismo lo que podría afectar en el desarrollo de los embriones. Ante esto se ha buscado emplear medios definidos con reemplazo del suero fetal con albúmina sérica bovina (BSA) (Rizos *et al.* 2003).

Se ha mostrado la influencia de adición de aminoácidos esenciales y no esenciales en el medio de cultivo embrionario, así como la importancia de mantener una atmósfera gaseosa equilibrada compuesta por 5% O₂, 5% CO₂ y 95% N₂ (Steeves & Gardner, 1999) (Tervit, Whittinham & Rowson, 1972).

III. ANTECEDENTES

A pesar de los esfuerzos por mejorar las condiciones de cultivo para la producción de embriones *in vitro*, existen discrepancias sobre cuáles son los factores que influyen en mayor medida al desarrollo de blastocistos. Ciertas evidencias afirman que la calidad intrínseca del ovocito juega un papel fundamental en el desarrollo de los embriones (Rizos *et al.* 2002). Con respecto a la fase de fecundación, Kochhar *et al.* 2003 mostraron que puede influir el tiempo de incubación de espermatozoides y ovocitos en el porcentaje de ovocitos divididos e incluso alterar la proporción machos: hembras. Por otro lado, algunos autores sugieren que los componentes del medio de cultivo embrionario juegan un papel muy importante en el desarrollo y calidad de los blastocistos (Lonergan *et al.* 2003).

Siempre existió la necesidad de establecer modelos de cultivo capaces de imitar el entorno en el que se desarrollan los folículos *in vivo*, es decir, conservar la arquitectura del folículo y permitir la adecuada comunicación entre el ovocito y las células que lo rodean. Para ello, y tomado en cuenta la importancia del arreglo espacial de las células, se vienen desarrollado los cultivos tridimensionales (Desai *et al.* 2010). En este camino, se han realizado investigaciones utilizando sistemas de encapsulación con hidrogeles de alginato y cultivos de microgotas en suspensión (Xu *et al.* 2011) (Nation and Selwood, 2009).

Hanging drop (HD) es una técnica de cultivo tridimensional que se utilizó en microbiología para observar el movimiento de bacterias en cultivo, ya que permite trabajar con volúmenes pequeños, es fácil de replicar y no requiere de mucho equipamiento (Webley 1958). Se cree que éste cultivo en 3D podría favorecer la comunicación paracrina entre las células del cúmulo y el ovocito a través de las uniones GAP, lo que resulta crucial para el desarrollo adecuado del oocito.

Ha sido utilizada en cultivo celular para estimular la diferenciación de células troncales y estudios de citotoxicidad (Banergee *et al.* 2006). Se observó un efecto de la técnica HD en la formación de cuerpos embrioides y diferenciación celular neuronal utilizando células madre embrionarias de ratón (Ohnuki *et al.* 2013). Se considera el método más adecuado para el cultivo primario de hepatocitos de búfalo y oveja (Shri *et al.* 2017).

Esta técnica también ha sido utilizada en embriología, mostrando un efecto sobre la tensión superficial de tejidos y la posición espacial entre las capas de tejido germinal del pez cebra (Schotz *et al.* 2005). Wang *et al.* 2012 utilizaron la técnica HD para madurar folículos preantrales de ratón, obteniendo un 94% de ovocitos madurados capaces de ser fertilizados y un 77% de ellos alcanzaron a desarrollarse hasta embriones. Recientemente, se demostró que el cultivo individual de ovocitos utilizando el HD mejoró la capacidad de fecundación y la calidad de los blastocistos de ratón (Nishio *et al.* 2014).

IV. HIPÓTESIS

Si existe diferencia en los patrones de desarrollo embrionario entre la técnica Hanging Drop y el cultivo convencional

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de ejecución

La siguiente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5.2 Tipo y diseño de investigación

El diseño experimental se realizó de acuerdo a los objetivos planteados. Fue un estudio prospectivo. Para determinar la efectividad del cultivo *in vitro* de ovocitos bovinos utilizando la técnica Hanging Drop sobre el desarrollo embrionario se evaluó la tasa de división de ovocitos fecundados, el porcentaje de mórulas y el porcentaje de blastocistos obtenidos.

5.3 Variables

Las variables independientes son las técnicas de cultivo Hanging Drop y el cultivo convencional. Las variables dependientes son la tasa de división de ovocitos fecundados, el porcentaje de mórulas y el porcentaje de blastocistos.

5.4 Operacionalización de las variables

Variable	Escala	Instrumento	Unidad de análisis	Definición
Independiente: Técnica de cultivo	Cualitativa nominal	-	Ovocito	Hanging Drop y técnica convencional
Dependiente: Tasa de división de ovocitos fecundados	Cuantitativa	Microscopio invertido Microscopio estereoscópico	Embrión	Observación de ovocitos en división (2-4 células)
Dependiente: Porcentaje de mórulas	Cuantitativa	Microscopio invertido Microscopio estereoscópico	Embrión	Observación a las 120 horas de embriones en estadio mórula (Más de 16 células)
Dependiente: Porcentaje de blastocistos	Cuantitativa	Microscopio invertido Microscopio estereoscópico	Embrión	Observación a las 168 horas de embriones en estadio blastocisto

5.5 Muestreo

El muestreo fue de tipo aleatorio. El N=10 se tomó como número de visitas al camal. En cada visita se colectaron 20 pares de ovarios o 40 ovarios en total. De los 40 ovarios se obtuvieron aproximadamente 200 ovocitos, de los cuales solo se seleccionaron 80 aproximadamente como aptos para experimentación. Se completó un total de 10 visitas como mínimo.

5.6 Procedimiento

- **Obtención del material biológico**

Se colectaron ovarios bovinos provenientes del SACIP Yerbateros ubicado en Avenida Nicolás Ayllón en el distrito de Ate, los cuales fueron depositados en un termo con 1lt de cloruro de sodio al 0.9% suplementado con solución de gentamicina (60mg/ml). Seguidamente se transportó al laboratorio a una temperatura entre 35°-37°C, en un tiempo no superior a 2 horas posteriores a su recolección. Al llegar, los ovarios fueron lavados con la solución señalada temperada a 37°C, y conservados en Baño María a la misma temperatura hasta la aspiración de los folículos.

- **Recuperación y selección de ovocitos**

Para el aislamiento de los complejos ovocitos-cúmulo (COC) se utilizó la técnica de aspiración folicular la cual consiste en la aspiración de folículos de 2 a 8mm con una jeringa de 5ml y aguja hipodérmica 18G. El contenido fue vertido en tubos cónicos de 15ml estériles y se dejaron sedimentar por quince minutos. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 4ml de medio de colección TCM-199 (Himedia) suplementado con 0.2mM de Piruvato de sodio (Sigma), 4.2mM NaHCO₃, 2.64g/L de HEPES y gentamicina 50mg/ml. Luego se depositó en una placa petri estéril donde los COCs fueron seleccionados bajo un microscopio estereoscópico Motic SMZ171 a 40X.

Para el proceso de selección se tomó en cuenta el siguiente criterio morfológico agrupado en 5 categorías:

- Grado A: COC con cuatro a más capas de células del cúmulo compactas unidas homogéneamente al ovocito. Todo el COC transparente y con citoplasma homogéneo.
- Grado B: COC con tres a cuatro capas de cúmulos compactas. Con el COC un poco más oscuro y menos transparente que el grado A y el citoplasma relativamente homogéneo.
- Grado C: COC con una o dos capas del cúmulo, menos compactos que los grados A y B, con citoplasma regular o irregular encogido.
- Grado D: COC con células del cúmulo parcial o totalmente ausentes, con citoplasma encogido.
- Grado E: COC con células del cúmulo completamente ausentes.

Se escogieron los ovocitos de Grado A y B para la experimentación (Yang *et. al* 2017) (Figura 5).

- **Maduración *in vitro***

Para la maduración *in vitro* se utilizó medio de maduración que contiene TCM-199 (Himedia) suplementado con FSH (Hormona Folículo Estimulante, Folltropin-V®) (20mg/ml), 17β-estradiol (1mg/ml) (Himedia), 10% SFB (Suero Fetal Bovino, Gibco), gentamicina 50mg/ml (Sigma), 2.2mg/ml de Piruvato de sodio (Sigma), 0.22g/L NaHCO₃. Para la técnica Hanging Drop se colocaron gotas de 40ul con medio de maduración en la tapa de una placa Petri estéril la cual fue invertida para que la gota quede suspendida. Se colocó PBS en la base de la placa para evitar la evaporación de las gotas (Fig. 6).

Para el cultivo convencional en microgotas se colocaron gotas de 40ul con medio de maduración en placas Petri estériles y cubiertas con aceite mineral estéril (Fig. 6).

Para ambas técnicas de cultivo se colocaron 10 COCs por cada gota e incubadas durante 24h a 38.5°C con 5% CO₂.

Después de 24 hrs de maduración los ovocitos fueron lavados en medio Human Tubal Fluid (HTF)-HEPES (InVitroCare®) a 37°C y colocados en medio HTF hasta su fecundación.

- **Capacitación espermática**

La fracción móvil del semen se obtuvo usando un gradiente de densidad Sil-Select Plus™ (FertiPro) (45% sobre 90%). La pajilla fue descongelada con agua templada a 37°C por un minuto, luego la muestra se colocó en un tubo con gradiente y centrifugado a 1500 rpm por 4 minutos. El pellet obtenido fue lavado en medio HTF-HEPES (InVitroCare®) suplementado con EFAF-BSA (Albúmina Sérica Bovina Libre de Ácidos Grasos) (Sigma) y centrifugado a 1000 rpm por 3 minutos.

- **Fecundación *in vitro***

Después de 24h de incubación, los ovocitos fueron fecundados con semen descongelado del toro Holstein Herodes (RG: 15320) proveniente del Banco Nacional de Semen de la Universidad Agraria La Molina. Para esto se capacitó la muestra seminal. Se agregaron 1×10^6 espermatozoides móviles/ml, aproximadamente 15ul de espermatozoides móviles capacitados para 500ul de medio de fecundación y se incubaron durante 18 horas a 38.5°C en 5% de CO₂. La fecundación se llevó a cabo en placas con gotas de 500ul de medio HTF InVitroCare® suplementado con Heparina Sódica 0.01mg/ml (Himedia), 20mM Cafeína (Sigma) y 6mg/ml de BSA (Sigma).

- **Desarrollo embrionario**

Después de 18h de FIV, los presuntos cigotos fueron removidos de espermatozoides y células de cúmulo remanentes mediante pipeteado con HTF-HEPES InVitroCare® templado a 37°C. Posteriormente, los cigotos fueron cultivados en placas con gotas de 1ml de medio G-TL™ (Vitrolife). Las placas fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético (Ziploc®) las cuales se mantuvieron en una atmósfera de gas equilibrado con la mezcla: 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, con un 100% de humedad a 38.5°C (Figura 6).

Pasadas las 48 horas post-fecundación se abrieron las bolsas para realizar el conteo de ovocitos divididos, es decir, los ovocitos que se encuentren en dos o cuatro células, mediante observación con microscopio estereoscópico Motic SMZ171. Luego de realizar dicho conteo se volvieron a colocar las placas en la mezcla de gases antes mencionada para continuar con el desarrollo. Se repitió el mismo procedimiento a las 120 y 168 hrs para determinar el porcentaje de mórulas y blastocistos respectivamente.

Para evaluar la tasa de ovocitos divididos se utilizó la fórmula:

$$\frac{\text{Número de oocitos en división}}{\text{Número de oocitos a fecundar}} * 100\%$$

Para cuantificar el porcentaje de mórulas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de mórulas observadas}}{\text{Número de oocitos a fecundar}} * 100\%$$

Para cuantificar el porcentaje de blastocistos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de blastocitos observados}}{\text{Número de oocitos a fecundar}} * 100\%$$

El día uno del desarrollo embrionario corresponderá al día que se colocaron los presuntos cigotos en la mezcla de gases.

5.7. Análisis de datos

Los datos recolectados fueron procesados utilizando el paquete estadístico R, los valores obtenidos de cada variable fueron expresados en su media con su respectiva desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Shapiro Wilk para comprobar su normalidad, si fueron estos normales se procedió a comparar los grupos utilizando la prueba paramétrica de T de Student para muestras independientes en caso contrario se realizó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon, para ambos casos se consideró $p < 0.05$ como un valor discriminativo.

VI. RESULTADOS

Tasa de recuperación de COCs

Para aislar los complejos ovocitos-cúmulo (COC) se aspiraron folículos de 2 a 8mm con una jeringa estéril. El contenido fue vertido en tubos cónicos de 15ml. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en 3 ml de medio de colección. Luego los COCs fueron seleccionados bajo un microscopio estereoscópico a 40X.

Se colectaron desde 42 hasta 76 ovarios por réplica. Se colectó un total de 406 ovarios de los cuales se recuperaron 1477 COCs, y a su vez, 584 COCs seleccionados como aptos para madurar (Tabla 1).

Tabla N°1. Número de COCs recuperados por réplica

Réplica	N° ovarios	N° COCs recuperados	N° COCs seleccionados
1	60	169	60
2	60	178	60
3	76	276	88
4	74	283	98
5	44	198	92
6	42	198	96
7	50	175	90
Total	406	1477	584

Maduración *in vitro*

Se seleccionaron 564 ovocitos los cuales fueron cultivados en medio TCM 199 suplementado con hormonas por 24 horas, divididos en dos grupos: cultivo con Hanging Drop y sin Hanging Drop. En ambos tratamientos se visualizó la expansión de las células del cúmulo al concluir el periodo de cultivo. Se les removió las células de cúmulo con hialuronidasa 0.1% (Himedia) para comprobar la presencia de corpúsculo polar, es decir alcanzaron metafase II. Se alcanzó una tasa de maduración máxima con el tratamiento hanging drop, con un 90% en

cambio sin hanging drop alcanzó un máximo de 80.76%; sin embargo, en ambos tratamientos hubo un mínimo de 50% de ovocitos madurados. En promedio, se obtuvo un 69.94% de ovocitos maduros con la técnica Hanging Drop, frente a un 66.47% con el cultivo convencional (Tabla 2), sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$) (Tabla 3).

Tabla N°2. Porcentaje de maduración de ovocitos para el tratamiento con y sin Hanging Drop

Tratamiento	Réplica	COCs Seleccionados	(%) Maduración
Hanging Drop	1	29	21/29 (72.4%)
	2	30	21/30 (70%)
	3	38	28/38 (73.6%)
	4	50	45/50 (90%)
	5	48	29/48 (60.41%)
	6	48	25/48 (52.08%)
	7	45	32/45 (71.11%)
	Total/Porcentaje	288	69.94%
Sin Hanging Drop	1	26	21/26 (80.76%)
	2	28	21/28 (75%)
	3	40	24/40 (60%)
	4	48	36/48 (75%)
	5	44	29/44 (65.9%)
	6	48	27/48 (56.25%)
	7	42	22/42 (52.38%)
	Total/Porcentaje	276	66.47%

Tabla N°3. Porcentaje promedio de ovocitos maduros para el tratamiento con y sin Hanging Drop

Tratamiento	N° ovocitos (Réplica)	N° ovocitos maduros (%)
Hanging Drop	288 (7)	201 (69.94%)a
Sin Hanging Drop	276 (7)	180 (66.47%)a

a, b Valores (media 7 repeticiones) con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($p < 0.05$).

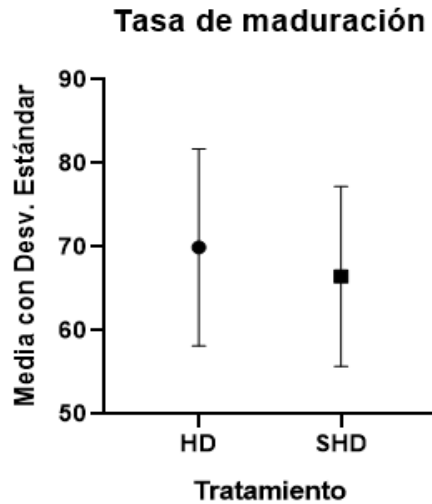


Fig. 1. Media porcentual de ovocitos maduros para el tratamiento con y Hanging Drop (HD) y el cultivo convencional (SHD)

Fecundación *in vitro*

Se seleccionaron 461 COCs para madurar, los cuales fueron separados en dos grupos para aplicar el tratamiento con Hanging Drop o cultivo convencional (sin Hanging Drop).

Después de 24h ambos grupos fueron fecundados con semen descongelado y capacitado de un toro certificado, se agregaron espermatozoides móviles capacitados en el medio de fecundación y se incubaron durante 18 horas con los ovocitos.

Los presuntos cigotos fueron removidos de espermatozoides y células de cúmulo remanentes para ser cultivados en placas con gotas de medio de cultivo de embriones. Las placas fueron colocadas en bolsas con cierre hermético y se mantuvieron en una atmósfera con mezcla de gases y 100% de humedad a 38.5°C.

Desarrollo embrionario

Pasadas 48 hrs posteriores a la fecundación se abrieron las bolsas con trigas y se realizó el conteo visual de ovocitos fecundados, es decir en dos células a más, el mismo procedimiento a las 120 para el conteo de mórulas y 168 horas para el conteo de blastocistos.

La tasa de división del grupo con el tratamiento Hanging Drop fue de 65.46% y desviación estándar de 17.04, mientras que el tratamiento sin Hanging Drop fue de 60.18% y 16.84 respectivamente (Tabla 4 y Fig. 2).

Tabla N°4. Porcentaje de desarrollo de embriones obtenidos con y sin el tratamiento Hanging Drop

Tratamiento	N° ovocitos (Réplica)	% Desarrollo		
		2 células	Mórulas	Blastocistos
Hanging Drop	237 (15)	65.46 ± 17.04a	59.43 ± 10.21a	41.93 ± 10.39a
Sin Hanging Drop	224 (15)	60.18 ± 16.84a	56.67 ± 17.21a	36.58 ± 10.86a

a, b Valores (media 7 repeticiones) con letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($p < 0.05$).

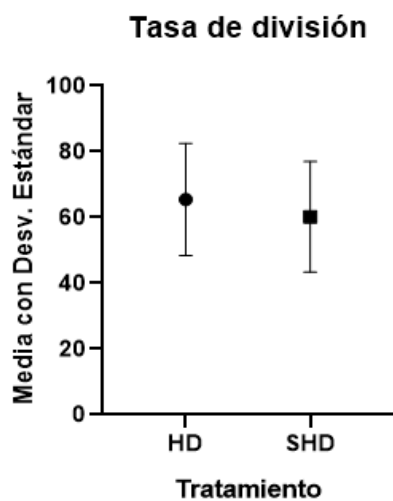


Fig. 2. Media porcentual de ovocitos en división para el tratamiento con Hanging Drop (HD) y el cultivo convencional (SHD)

El porcentaje promedio de mórulas fue mayor para el tratamiento Hanging Drop con un 59.43% frente a un 56.67% sin Hanging Drop. Sin embargo, la desviación estándar del tratamiento Hanging Drop fue menor con un 10.21 en comparación con un 17.21 para el tratamiento sin Hanging Drop, es decir, hubo menor variabilidad de datos para el tratamiento Hanging Drop (Tabla 4 y Fig. 3).

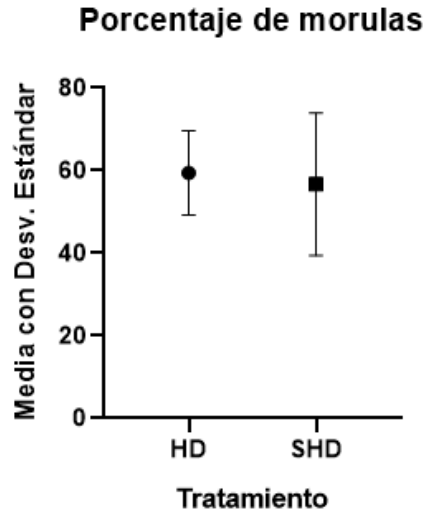


Fig. 3. Media porcentual de mórulas obtenidas para el tratamiento con Hanging Drop (HD) y el cultivo convencional (SHD)

El porcentaje promedio de blastocistos obtenidos fue de 41.93% para el tratamiento Hanging Drop y 36.58% para el cultivo convencional. Además, hubo similitud en los valores de desviación estándar para ambos tratamientos (Tabla 4 y Fig. 4).

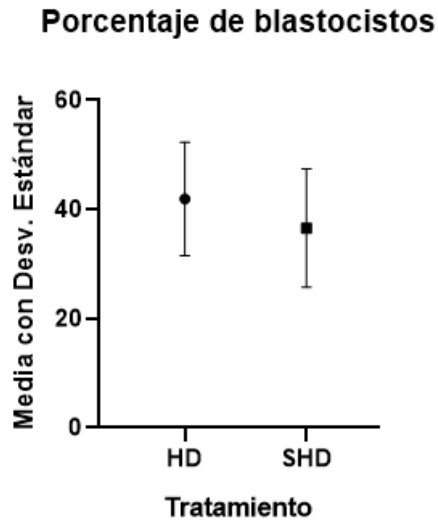


Fig. 4. Media porcentual de blastocistos obtenidos para el tratamiento con Hanging Drop (HD) y el cultivo convencional (SHD)

En ambos grupos se observó diferencia en el promedio porcentual para la tasa de división, mórulas y blastocistos más no hubo diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las etapas de desarrollo embrionario ($p < 0.05$) (Tabla 4).

VII. DISCUSIÓN

Existen varios factores que influyen en la capacidad de maduración de ovocitos en vacas. Para que se produzca una correcta maduración éstos deben adquirir competencia a través de la maduración citoplasmática, mediante la expansión de células del cúmulo, y meiótica al expulsar el segundo corpúsculo polar lo que evidencia que se reanudó la meiosis y se alcanzó la metafase II (Conti & Franciosi, 2018).

Además de la competencia que deben adquirir, el origen de los ovocitos obtenidos influye en la tasa de maduración ovocitaria. Esto fue reportado anteriormente por Quispe *et al.* 2018 demostrando que existe una diferencia en la obtención de ovocitos mediante OPU (Ovum Pick Up) frente a la obtención de ovocitos por colecta de ovarios de matadero. Sin embargo, es posible superar esta heterogeneidad utilizando un sistema de clasificación que involucra la selección de folículos a aspirar y la categorización de ovocitos según sus características morfológicas.

Se alcanzó una tasa de maduración máxima con el tratamiento hanging drop de 90% mientras que el cultivo convencional sólo alcanzó un 80.76%. En promedio, se obtuvo un 69.94% de ovocitos maduros con la técnica Hanging Drop, frente a un 66.47% con el cultivo convencional (Tabla 3), sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos. Éstos resultados difieren con los obtenidos por Nishio *et al.* 2014, ya que alcanzaron un promedio de 77% de ovocitos en metafase II tanto para el cultivo con hanging drop como el convencional. Ésta diferencia podría estar influenciada por el número de ovocitos que se coloca en la gota de cultivo ya que anteriormente Nishio *et al.* 2011 reportaron que existe diferencia entre el cultivo individual y grupal de COCs.

Un ovocito que se considera maduro debería ser capaz de dividirse posterior a la fertilización, sin embargo, existe la posibilidad que la muestra seminal presente algún tipo de disfunción, como una incorrecta descondensación o un pronúcleo asincronizado (Sirard *et al.* 2006). Una vez superada la tasa de maduración ovocitaria es necesario controlar el factor espermático ya que se ha encontrado que el estrés oxidativo de la muestra seminal podría afectar la tasa de división y posterior desarrollo del blastocisto (Castro *et al.* 2015).

La tasa de división el grupo con el tratamiento Hanging Drop obtuvo un porcentaje promedio de 65.46%, mientras que el tratamiento sin Hanging Drop fue de 60.18% (Tabla 4). Estos nos indican que los ovocitos alcanzaron una correcta maduración descartando así el posible efecto causado por el estrés oxidativo de la muestra seminal. Cabe resaltar que se utilizaron muestras de un mismo toro para reducir el efecto del individuo sobre la capacidad de fertilización de los ovocitos.

Para alcanzar el estadio de blastocisto el ovocito fecundado debe pasar por una serie de procesos que incluyen divisiones sucesivas, reprogramación epigenética, activación del genoma embrionario, compactación, diferenciación en dos linajes celulares y desarrollar la cavidad o blastocelo. La mayoría de embriones tempranos que no alcanzan el estadio de blastocisto se encuentran bloqueados en el estado de 8 células, es decir, cerca de la etapa de transición materna a cigótica en la cual se activa la transcripción en el embrión y se reemplaza el ARN materno con el ARN embrionario (Vigneault *et al.* 2004). El presente trabajo consiguió superar el bloqueo ya que se obtuvo un porcentaje promedio de mórulas y blastocistos de 59.43% y 41.93% para el tratamiento Hanging Drop frente a un 56.67% y 36.58% sin Hanging Drop (Tabla 4). En ambos grupos se observó diferencia en el promedio porcentual para la tasa de división, mórulas y blastocistos más no hubo diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las etapas de desarrollo embrionario ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos en este experimento podrían sugerir un efecto del Hanging Drop sobre el método convencional ya que se alcanzaron porcentajes altos tanto para la tasa de maduración como para los parámetros de desarrollo embrionario lo cual se podría ver influenciado por la comunicación paracrina entre las células del cúmulo y el ovocito a través de las uniones GAP, lo que resulta crucial para el desarrollo adecuado del ovocito.

VIII. CONCLUSIONES

- Se evidencia una diferencia porcentual en la tasa de maduración, así como en la tasa de división a las 48 horas con el tratamiento Hanging Drop con respecto al control.
- Se evidencia una diferencia porcentual en la obtención de mórulas a las 120 horas y obtención de blastocistos a las 168 horas con el tratamiento Hanging Drop con respecto al control.
- Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa en los patrones de desarrollo embrionario con el tratamiento Hanging Drop aun cuando se encontró una diferencia porcentual.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banerjee Meenal & Bhonde Ramesh. 2006. Application of hanging drop technique for stem cell differentiation and cytotoxicity studies. *Cytotechnology*. 51: 1–5.
2. Blondin, Patrick & Sirard, Marc. 1995. Oocyte and Follicular Morphology as Determining Characteristics for Developmental Competence in Bovine Oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 41: 54-62
3. Brevini TA, Cillo F, Antonini S, Tosetti V, Gandolfi F. 2007. Temporal and spatial control of gene expression in early embryos of farm animals. *Reprod Fertil Dev*. 19, 35–42.
4. Conti, Marco & Franciosi, Federica. 2018. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Human Reproduction Update*, Vol.24, No.3 pp. 245–266. doi:10.1093/humupd/dmx040
5. De Castro, Letícia S., De Assis, Patrícia M., Siqueira, Adriano F. P., Hamilton, Thais R. S., Mendes, Camilla M., Losano, João D. A., Nichi, Marcílio., Visintin, José A., Assumpção, Mayra E. O. A. 2015. Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A Dose Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2016, Article ID 8213071, 12 pages. Doi: <https://doi.org/10.1155/2016/8213071>.
6. Dempsey, C. W. 1937. Follicular growth rate and ovulation after various experimental procedures in the guinea pig. *American Journal of Physiology*. 120:126.
7. Desai. N, Alex. A, AbdelHafez. F, Calabro. A, Goldfarb. J, Fleischman. F, Falcone. T. (2010). Three-dimensional *in vitro* follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8:119
8. Duranthon. V., Renard. J. P. 2001. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55, 1277–1289.
9. Fair. T., Hyttel. P., Lonergan. P., Boland. M.P. 2001. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization. *Biol Reprod* 64, 1516–1525.

10. Florman. HM, First. NL. 1988. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida *in vitro*. *Biological Reproduction*. 38 (5): 1171-80.
11. Hansel W, Convey E. Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 1983. Vol. 57, Supplement 2: 404–424.
12. Kinder J, Day M, Kittok R. 1987. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. *Journal Reproduction Fertility Suppl*. 34:167–186.
13. Kochhar. H.S, Kochhar. K. P., Basrur. P. K., King. W. A. 2003. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*. 77: 33–49.
14. Lee. C.N., Ax. R. L. 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *Journal of Dairy Science*. 67(9): 2006-9.
15. Levasseur M. C. 1979. Thoughts on puberty. The gonads. *Annual Biol Anim Biochim Biophys*. Vol 19: 321–335.
16. Lonergan P., Rizos. D., Kanka. J., Nemcova. L., Mbaye. A. M., Kingston. M., Wade. M., Duffy. P., Boland. M. P. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*. 126: 337–346.
17. Matton, P., V. Adalakoun, Y. Couture and J. J. Dufour. 1981. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J. Anim. Sci*. 52: 813.
18. Mendes Jr., J.O.B; Burns, P.D; De La Torre-Sánchez, J.F; Seidel Jr., G.E. 2003. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology* 60, 331–340.
19. Moran C, Quirke J, Roche J. 1989. Puberty in heifers: a review. *Animal Reproduction Science*. Vol 18:167–182.
20. Nation. A. & Selwood. L. 2009. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. *Reproduction*. 138: 247–255.
21. Nishio, Manami; Hoshino, Yumi; Sato, Eimei. 2011. Effect of droplet size and number of oocytes examined on mouse oocyte quality in *in vitro* maturation. *Journal*

- of Mammalian Ova Research, Vol. 28, 53–60. doi:
<http://dx.doi.org/10.1274/jmor.28.53>
22. Nishio. M., Hoshino.Y, Tanemura. K., Sato. E. 2014. Effect of single-oocyte culture system on *in vitro* maturation and developmental competence in mice. *Reprod Med Biol.* 13: 153–159.
 23. Niwa K, Park CK, Okuda K. 1991. Penetration *in vitro* of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. *Journal of Reproduction Fertility.* 91(1): 329-36.
 24. Norris, R. P. *et al.* 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 136, 1869–1878.
 25. Ohnuki Yoshitsugu and Kurosawa Hiroshi. 2013. Effects of hanging drop culture conditions on embryoid body formation and neuronal cell differentiation using mouse embryonic stem cells: Optimization of culture conditions for the formation of well-controlled embryoid bodies. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* Vol. 115. No. 5: 571-574.
 26. Parrish. J; Susko-Parrish. J; First. N. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin is correlated with 3H-heparin binding and is blocked by protamine sulfate. *Biological Reproduction.* 38 (Suppl 1): 59.
 27. Quispe, Carlos., Ancco, Edith., Solano, Juan., Unchupaico, Ide., Mellisho, Edwin. 2018. Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Rev Inv Vet Perú.* Vol 29 (4): 1114-1121. Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418>
 28. Rahe C, Owens R, Fleeger J, Newton H, Harms P. 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology.*107: 498–503.
 29. Rizos. D., Gutiérrez-Adán. A., Pérez-Garnelo. S., de la Fuente. J., Boland. M.P., and Lonergan. P. 2003. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. *Biology of Reproduction.* 68, 236–243.
 30. Rizos. D, Lonergan. P, Ward. F, Duffy. P, and Boland. M. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus

- in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction Development*. 61: 234–248.
31. Schams D, Schallenberger E, Gombe S, Karg H. 1981. Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. *Journal Reproduction Fertility. Supplement* 30: 103–110.
 32. Schötz. E, Burdine. R, Jülicher. F, Steinberg. M, Heisenberg. C, Foty. R. (2005). Quantitative differences in tissue surface tension influence zebrafish germ layer positioning. *HFSP Journal* Vol. 2, No. 1, 42–56
 33. Sirard, Marc-Andre., Richard, Francois., Blondin, Patrick., Robert, Claude. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. Vol.65: 126–136
 34. Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biological Reproduction*. 39:546–52.
 35. Shri. M; Agrawal. H; Rani. P; Singh. D & Onteru. S. 2017. Hanging Drop, A Best Three-Dimensional (3D) Culture Method for Primary Buffalo and Sheep Hepatocytes. *Scientific Reports*. 7 (1): 1203.
 36. Steeves T.E. & Gardner D.K. (1999). Temporal and Differential Effects of Amino Acids on Bovine Embryo Development in Culture. *Biology of Reproduction* 61, 731–740
 37. Tervit H. R., Whittingham D. G. & Rowson L. E. A. (1972). Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility* 30, 493-497.
 38. Vigneault, Christian; McGraw, Serge; Massicotte, Lyne; Sirard, Marc-André. 2004. Transcription Factor Expression Patterns in Bovine *in Vitro*-Derived Embryos Prior to Maternal-Zygotic Transition. *Biology of reproduction*. Vol. 70, 1701–1709. Doi: 10.1095/biolreprod.103.022970
 39. Wang. W., Tang.Y., Ni. L., Jongwutiwes. T., Liu. H., Rosenwaks. Z. 2012. A modified protocol for *in vitro* maturation of mouse oocytes from secondary preantral follicles. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. Vol. 3: 57-74.
 40. Webley. D. 1953. A Simple Method for Producing Microcultures in Hanging Drops with special reference to Organisms Utilizing Oils. *Journal gen Microbiology*. 8, 66-71.

41. Xu, J, Lawson, M, Yeoman, R, Pau, K, Barrett, S, Zelinski M. and Stouffer, R. 2011. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotropins, oxygen and fetuin. *Human Reproduction*. Vol 26 (5): 1061-1072.
42. Xu, M., Banc, A., Woodruff, T. K., and Shea, L. D. 2009. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. *Biotechnol Bioeng*. 103, 378–386.
43. Yang, Minghui; Tao, Jingli; Chai, Menglong; Wu, Hao; Wang, Jing; Li, Guangdong; He, Changjiu; Xie, Lu; Ji, Pengyun; Dai, Yunping; Yang, Ligu & Liu, Guoshi. 2017. Melatonin Improves the Quality of Inferior Bovine Oocytes and Promoted Their Subsequent IVF Embryo Development: Mechanisms and Results. *Molecules*, 22, 2059; doi:10.3390/molecules22122059

X. ANEXOS

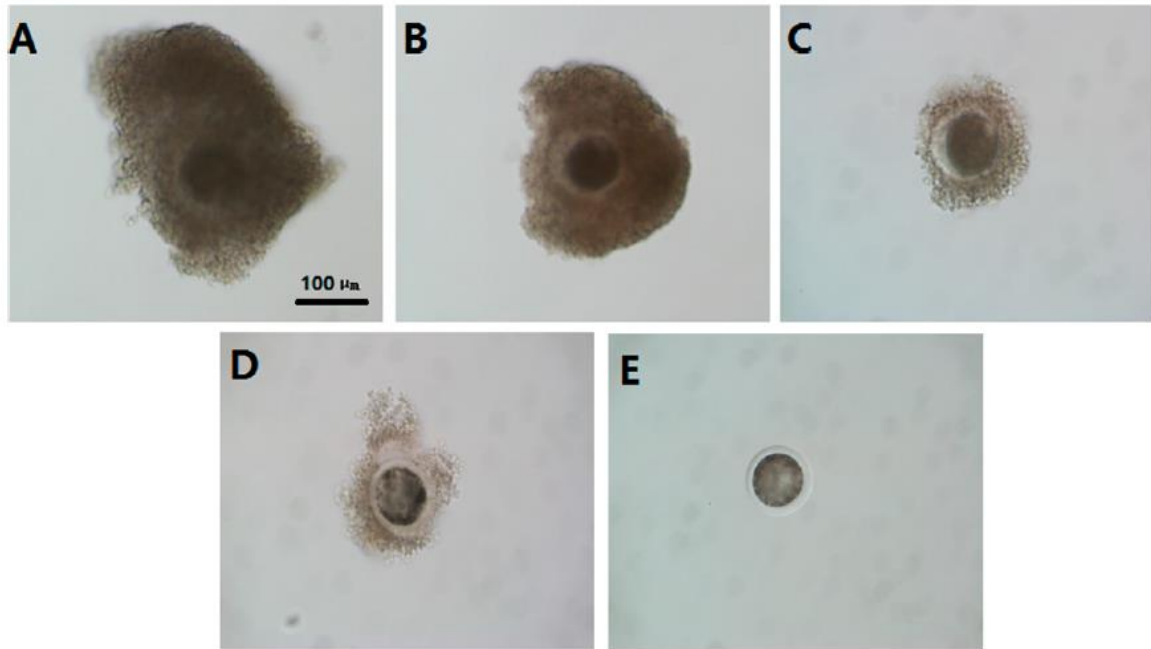


Fig. 5. Observación de cinco categorías de clasificación de ovocitos bovinos

(Imagen tomada de Yang et al. 2017)

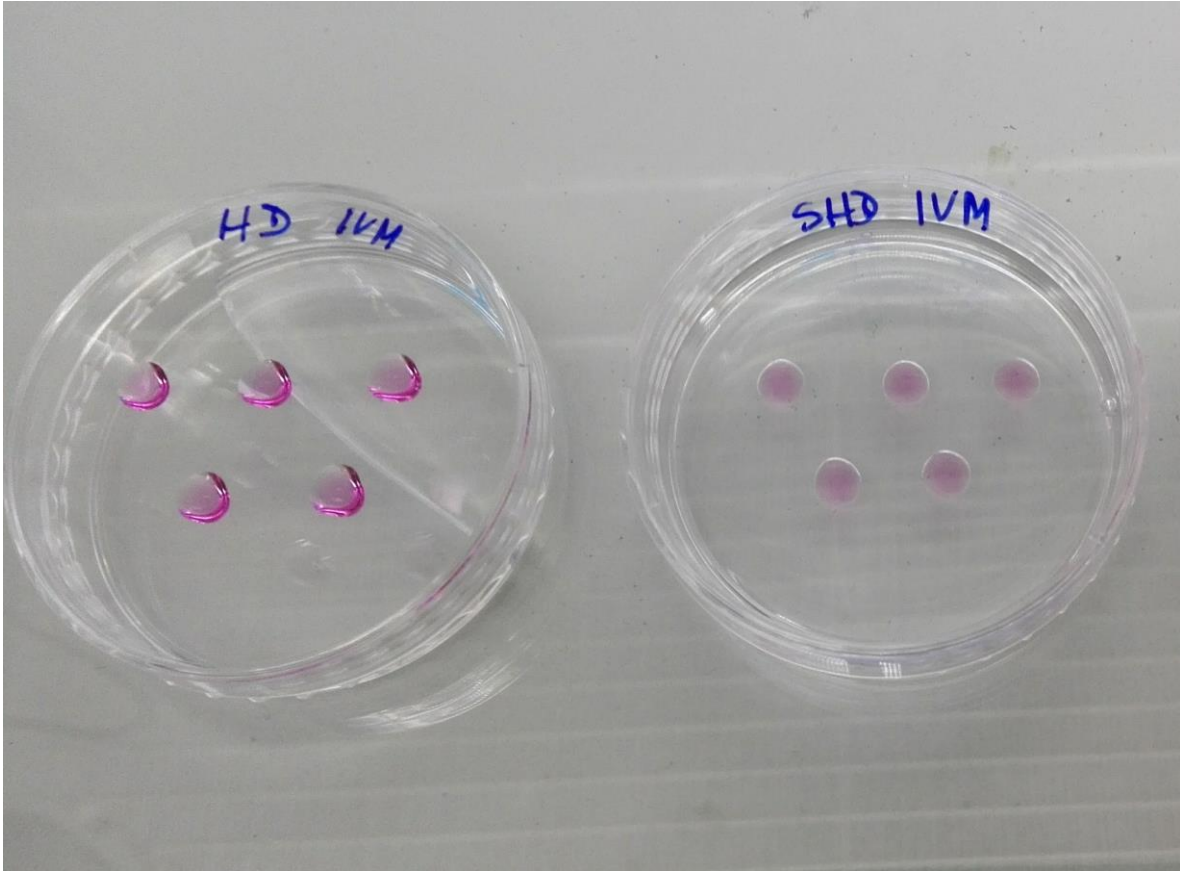


Fig. 6. Técnica de cultivo Hanging Drop (HD) y cultivo convencional (SHD)
(Imagen propia tomada con celular Motorola G3)

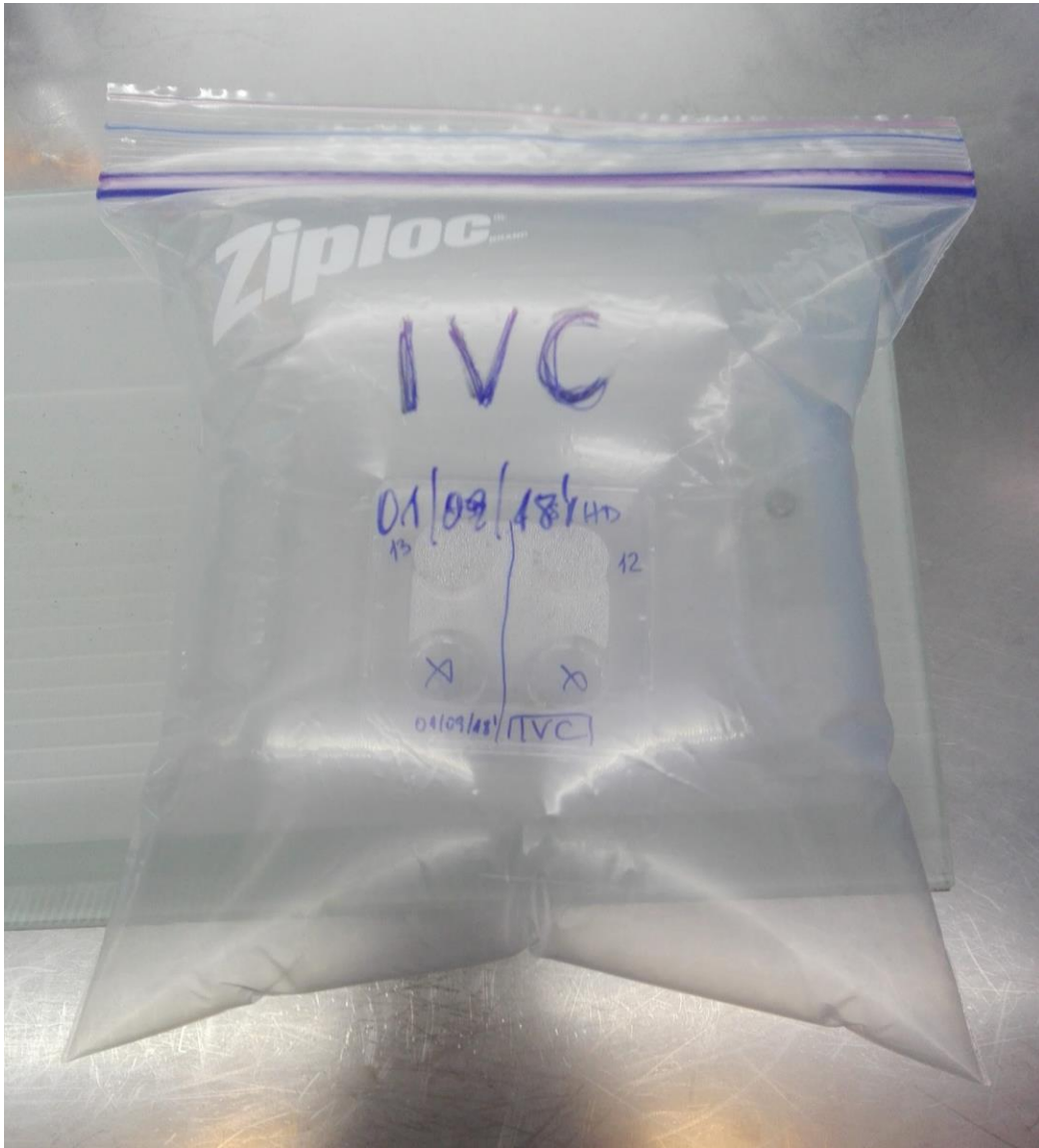


Fig. 7. Proceso incubación con mezcla de gases de embriones en bolsa hermética
(Imagen propia tomada con celular Motorola G3)