

**Informe pasantía práctica empresarial en la agropecuaria búfalos del sur de Santa Bárbara
del Zulia – Venezuela**

Angie Stefanny Granados Moncada

Programa de Medicina Veterinaria, Universidad de Pamplona

Trabajo de grado

Junio 20 de 2023

Nota de los autores

Trabajo de grado, Melissa Casadiegos Muñoz, docente de Medicina Veterinaria,
Universidad de Pamplona.

La correspondencia relacionada con este documento deberá ser enviada:

angie.granados2@unipamplona.edu.co

Agradecimientos

Porque *“nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado”* (M. Gandhi), este trabajo ha sido posible, a Dios gracias primeramente por permitirme culminar esta experiencia, a la Universidad de Pamplona por formarme y guiarme durante mi carrera profesional, a mis padres por el apoyo brindado y a la agropecuaria Búfalos del Sur por abrirme las puertas en este campo ofreciendo los recursos necesarios, con el acompañamiento y respaldo de los médicos veterinarios José Jiménez y Everaldo Oliveros a quienes también agradezco por su tutoría durante todo el proceso.

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR	3
Tabla de contenido	
Introducción	9
Descripción del sitio de prácticas	10
Actividades desarrolladas durante la práctica empresarial	11
Producción in vitro de embriones de búfalas en el estado Santa Bárbara del Zulia	13
Resumen	13
Abstract	13
CAPITULO I	15
1.1 Planteamiento del problema	15
1.2 Justificación	16
1.3 Objetivos	18
1.3.1 Objetivo general	18
1.3.2 Objetivos específicos	18
CAPITULO II	19
2.1 Introducción	19
2.2 Revisión bibliográfica	21
2.2.1 Desarrollo del folículo y del ovocito	21
2.2.2 Fluido folicular	22
2.2.3 Producción in vitro de embriones	23
2.2.4 Colecta y selección de ovocitos	23

	4
INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR	
2.2.5 Medio de cultivo	25
2.2.5.1 Osmolaridad	25
2.2.5.2 pH	26
2.2.5.3 CO ₂ y O ₂	26
2.2.5.4 Fluido oviductal	26
2.2.5.5 El agua	26
2.2.5.6 Fuente de energía	27
2.2.5.7 Fuente de proteína	27
2.2.6 Maduración in vitro	28
2.2.7 Fecundación in vitro	29
2.2.7.1 Capacitación espermática	30
2.2.8 Cultivo in vitro	31
CAPITULO III	33
3.1 Metodología	33
3.1.1 Estudio correlacional de variables	33
3.1.1.1 Estudio de campo	33
3.1.1.2 Estudio descriptivo	33
3.1.1.3 Estudio no experimental	33
3.1.2 Población total	33
3.1.3 Muestra	33

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR	5
3.1.4 Variables	34
3.1.5 Recolección de ovocitos	34
3.1.6 Maduración in vitro	35
3.1.7 Fertilización in vitro	36
3.1.8 Cultivo in vitro	37
CAPITULO IV	38
4.1 Resultados	38
4.2 Discusión	42
CAPITULO V	45
5.1 Conclusión	45
5.2 Recomendaciones	46
5.3 Referencias	47

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Embrión día 3</i>	39
Figura 2. <i>Embrión día 7-8</i>	40
Figura 3. <i>Cantidad total de ovocitos desarrollados a blastocito</i>	41

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Clasificación de ovocitos</i>	25
Tabla 2. <i>Cantidad de ovocitos OPU</i>	38
Tabla 3. <i>Cantidad de ovocitos planta de beneficio</i>	39

Abreviaturas

APG: Albúmina-Piruvato-Gentamicina

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CGPs: Células Germinales Primordiales

CIV: Cultivo in vitro

COCs/CCOS: Complejo Cúmulo Ovocito

FIV: Fecundación in vitro

HHE: Hipotaurina-Heparina-Epinefrina

IA: Inseminación Artificial

MIV: Maduración In Vitro

OPU: Extracción de ovocitos/Ovum Pick Up

PIV: Producción in vitro

PIVE: Producción in vitro de embriones

PVA: Polivinil Alcohol

PVP: Polivinil Pirrolidona

SFB: Suero Fetal Bovino

SOFa: Fluido Oviductal Sintético

TCM: Medio de Cultivo Tisular

ZP: Zona pelúcida

Introducción

La medicina veterinaria es la rama de las ciencias médicas encargada de curar o disminuir las enfermedades y lesiones de los animales, donde se toman una serie de medidas preventivas evitando futuras complicaciones; lo que influye a su vez en la salud pública, con la protección de la población hacia una gran variedad de enfermedades zoonóticas.

La mayor parte de los nuevos patógenos que afectan a los seres humanos tienen su origen en especies animales. Por ende, se requiere de una prevención de la difusión de las mismas, para esto se debe tener la mayor formación y educación sobre el tema, lo que le corresponde en gran medida al médico veterinario.

Con base a esto, el programa de Medicina Veterinaria de la Universidad de Pamplona, dentro de su misión forma profesionales competentes e íntegros los cuales opten como primera instancia por el bienestar del animal, que va de la mano con la salud pública. Siendo así, el décimo semestre de la carrera está orientado a cumplirse el proceso de trabajo de grado como uno de los requisitos indispensables para obtener el título de Médico Veterinario. Estas se llevan a cabo en un tiempo de 4 a 6 meses según corresponda, donde la institución ofrece diversos sitios de elección con los que se tiene convenio para su realización.

La pasantía juega un papel sustancial en el desarrollo del estudiante como futuro médico veterinario, logrando un enriquecimiento teórico práctico del conocimiento adquirido a lo largo de la carrera. De modo que introduce al estudiante en el ámbito laboral donde se va a desempeñar respecto al área de enfoque de elección en su futura vida profesional.

Descripción del sitio de prácticas

La compañía Agropecuaria Búfalos del Sur C.A. (BUFASUR), ubicada en Santa Bárbara del Zulia – Venezuela, fue fundada en el año 2006 por el Grupo Empresarial Ocando con la finalidad de impulsar la cría y engorde de ganado bufalino de doble propósito (carne y leche) en la zona Sur del Lago de Maracaibo. Siendo actualmente una de las empresas más reconocidas a nivel nacional, abasteciendo la población de Zulia y gran parte de Venezuela.

Entre las bufaleras que comprende toda la empresa, las principales están ubicadas en el sur del estado Zulia; como lo son San Andrés, El Tuy, Moscó, Complejo las Delicias, Santa Bárbara, Santa Sofía, El Carmen, Canta Rana y Santa Inés. Contando con un aproximado de 21.500 búfalos de agua y 400 equinos.

Dentro de sus instalaciones cuenta con dos oficinas principales, donde se ubica el personal encargado de manejar toda la logística y administración de la finca; una de ellas ubicada en San Carlos – Zulia y la otra en la finca principal de BUFASUR “Las Delicias”.

Cuenta con un centro de biotecnología reproductiva y laboratorio animal, denominado BIOSUR el cual dispone de diversos tipos de implementos y/o equipos como lo son microscopios, centrífuga, incubadoras, congeladores, ecógrafos, esenciales para la realización de las diferentes actividades.

Los profesionales a cargo de la producción de cada una de las fincas son, el MVZ. Everaldo Oliveros, MVZ. José Jiménez y el MVZ. Leandro Salas, los cuales ejecutan las diferentes tareas para mantener el bienestar de los animales en óptimas condiciones y, por ende, buen desempeño en las producciones a las que estos se destinan.

Actividades desarrolladas durante la práctica empresarial

Las actividades llevadas a cabo durante el periodo de pasantía práctica empresarial en la Agropecuaria Búfalos del Sur en la Hacienda San Andrés, consistió principalmente en llevar un control de los animales, con la constante observación del estado sanitario de estos por los diferentes potreros; efectuando a su vez actividades como:

- Charlas sobre el ciclo y proceso reproductivo de las búfalas, reforzando los conocimientos adquiridos en los semestres anteriores.
- Palpación transrectal tradicional y con uso de ultrasonografía en múltiples animales, favoreciendo el gran número de animales que la finca cuenta (más de mil búfalas) y diversas bufaleras para su manipulación.
- Reconocimiento de estructuras del órgano reproductor de la hembra, identificando a su vez anomalías o patologías, como también diagnosticar gestaciones.
- Registro de nacimientos y mortalidad diaria de los animales.
- Identificación de animales jóvenes con el uso de chapetas y microchips.
- Vacunación contra fiebre aftosa, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Clostridium* y *Pasteurella multocida*.
- Aplicación semanal a distintos hatos de animales productos como vitaminas B-12, D3, E, Combecon (vitaminas B-12, B-1 y B-6), antiparasitarios como Ivermectina, Calbomax (doramectina 1%) y baños de aspersion con Amitraz y Cipermetrina.
- Tratamientos clínicos ya sea de intervención quirúrgica o únicamente farmacológica. Sumando actividades como descornes, orquiectomías y curación de heridas.
- Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en búfalas.
- Participación en cursos en el transcurso de la práctica por parte de la empresa.

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR

En la parte de laboratorio BIOSUR se lleva un proceso de aprendizaje realizando actividades como:

- Producción in vitro de embriones de búfalas; partiendo de la recolección de ovocitos mediante dos formas, por medio de ultrasonografía guiada en campo y recolección de ovarios de hembras en la planta de beneficio.
- Maduración, fecundación y cultivo in vitro de embriones bufalinos.
- Congelación de pajillas de semen de búfalo, según el protocolo establecido.

Producción in vitro de embriones de búfalas en el estado Santa Bárbara del Zulia - Venezuela

Resumen

El método de producción de embriones in vitro (PIVE) en búfalas, es una biotecnología reproductiva que favorece el mejoramiento genético, y a su vez aporta en áreas de estudio. Para el desarrollo de esta técnica se obtienen ovocitos recuperados de ovarios ya sea por medio de aspiración con ultrasonografía guiada en animales vivos o recuperados de ovarios de donadoras con destino a planta de beneficio; estos son transportados al laboratorio, donde se seleccionan los ovocitos más aptos siendo los grado I y grado II, los cuales se someten a procesos de maduración in vitro para su posterior fertilización con espermatozoides que tienen que pasar por una capacitación previa para posteriormente pasarse a un medio de cultivo in vitro y así conseguir un embrión óptimo entre los días 7 y 8. Por medio de este trabajo se describen los pasos realizados en cada etapa de la producción in vitro de embriones de búfalos de la raza Murrah y Mediterránea, a partir de los dos métodos de aspiración folicular con la adecuación de medios usados normalmente en la producción in vitro de embriones vacunos, logrando obtener como resultado final un 22,3% de embriones idóneos para ser transferidos de los 286 ovocitos recolectados inicialmente.

Palabras claves: fecundación, maduración, cultivo, ovocitos, espermatozoides.

Abstract

The in vitro embryo production method (PIVE) in buffaloes is a reproductive biotechnology that favors genetic improvement, and in turn contributes to study areas. For the development of this technique, oocytes recovered from ovaries are obtained either by aspiration with guided ultrasonography in live animals or recovered from ovaries of donors from the

slaughter plant; these are transported to the laboratory, where the most suitable oocytes are selected, being grade I and grade II, which are subjected to in vitro maturation processes for their subsequent fertilization with spermatozoa that have to go through prior training to later be move to an in vitro culture medium and thus achieve an optimal embryo between days 7 and 8. Through this work, the steps carried out in each stage of the in vitro production of buffalo embryos of the Murrah and Mediterranean breed are described, based on the two methods of follicular aspiration with the adaptation of the media normally used in in vitro production. Of bovine embryos, obtaining as a final result 22.3% of suitable embryos to be transferred from the 286 oocytes initially collected.

Keywords: fertilization, maturation, culture, oocytes, sperm.

CAPITULO I

1.1 Planteamiento del problema

Venezuela se cataloga actualmente como líder en rebaño bufalino en el continente americano, esto lo expone Nicola Fabozzo, presidente de Criabúfalos de este país quien asegura que en este territorio hay aproximadamente 2 millones 500 mil cabezas de búfalo, a su vez afirma que la producción lechera está en 2 millones y medio de litros anuales, de los cuales el 40% es leche de búfala (La Verdad, 2023).

Considerando los últimos indicadores bufalinos se ha podido observar que su producción está siendo más rentable en comparación con el ganado vacuno, presentando aumentos significativos los últimos 20 años en toda América Latina (Campos et al., 2022). En vista de la creciente demanda de alimentos de origen animal; tanto de leche como de carne, se requiere de métodos que promuevan la reproducción masiva de animales con alto valor genético para con esto aumentar la productividad y oferta de dichos alimentos. Así pues, con el presente proyecto se busca aplicar las técnicas de producción de embriones in vitro que se manejan convencionalmente en el ganado vacuno, adaptándolas a la especie bufalina y con esto lograr obtener embriones idóneos para el mejoramiento de producciones en hatos bufalinos. Al mismo tiempo, se pretende influenciar al receptor a incluir este tipo de biotecnología reproductiva en las prácticas ganaderas actuales, lo que aporta a su vez, en las investigaciones de estudio de este campo.

Con este tipo de biotecnología reproductiva logramos suplir las necesidades del alto número de consumidores, donde se obtienen productos bufalinos cumpliendo la exigencia de los mismos siendo de alta calidad y trazabilidad.

1.2 Justificación

Mediante el establecimiento de biotecnologías reproductivas como lo es la producción de embriones in vitro y los análisis genéticos, estamos asegurando animales con mejor potencial genético y a su vez, disminuyendo la transmisión de enfermedades venéreas que se pueden generar en la reproducción por monta natural. Así pues, este proceso de PIVE va de la mano con el proceso de recolección de semen que se usa en inseminación artificial (IA) para lograr la fecundación in vitro; lo que permite un mayor aprovechamiento del macho ya que en una monta natural el búfalo deposita en la hembra la totalidad del semen en una sola eyaculación, mientras que por IA este mismo semen puede ser diluido y rendir para más animales pudiendo duplicar su cantidad inicial, sumándole que con una correcta congelación se puede preservar para futuros usos.

Una de las ventajas que aporta la especie bufalina es la capacidad de dar cría cada 11 meses, lo que no sucede con las vacas, que deben esperar de 16 a 18 meses para volver a criar (Gutiérrez, 2012); lo cual permite la obtención de un mejor rendimiento a bajo costo lo que en términos generales se resume como mayor ganancia económica para el productor, supliendo a su vez la demanda de alimentos del consumidor.

Eventualmente, la contribución de esta especie en la alimentación humana ha ido evolucionando los últimos años, donde se evidencia un aumento en el consumo tanto de leche bufalina como de su carne, donde por medio de La FAO indica que las búfalas producen entre 1,500 y 4,500 litros de leche por lactación, dado que pueden proporcionar crías y leche hasta después de los 20 años de edad (Huertas, 2018).

Siendo así, la leche de búfala tiene un tenor graso que por lo general duplica el de la leche de vaca y es una especie que digiere con facilidad alimentos pobres en nutrientes permitiendo el

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR

aprovechamiento de diversos ecosistemas (Huertas, 2018). Lo que en términos de producción denota una gran ventaja frente al ganado vacuno y una mayor rentabilidad para el productor. En consecuencia, se ha motivado la búsqueda de mejorar el potencial productivo en hatos bufaleros, donde actualmente la producción in vitro de embriones (PIVE) es una biotecnología reproductiva de elección que promete grandes avances en la mejora de este campo, permitiendo la obtención de embriones a bajo costo con fines de aumentar el desarrollo genético.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la producción de embriones de búfala in vitro a partir de dos técnicas diferentes de recolección de ovocitos.

1.3.2 Objetivos específicos

Validar la técnica de producción in vitro de embriones de búfala basándonos en las realizadas en la especie vacuna.

Cultivar ovocitos in vitro capaces de alcanzar la etapa final de blastocitos llegando a ser aptos para ser transferidos.

Adecuar el uso de los principales medios de cultivos vacunos para la producción in vitro de embriones en la especie bufalina.

Favorecer el mejoramiento genético mediante la producción in vitro de embriones bufalinas.

CAPITULO II

2.1 Introducción

Los Búfalos de Agua o río (*Bubalus bubalis*) son rumiantes pertenecientes a la familia *Bovidae*, que tuvo su origen en Asia y se cree que su aparición se dio hace 10 mil años, hoy en día se reportan 19 razas de la especie *Bubalus bubalis sp.* en el mundo, las cuales son de doble propósito, sin embargo, dentro del presente proyecto se enfocara en las razas Murrah y Mediterránea.

La ganadería de búfalos en Venezuela a diferencia de la vacuna no ha sido resultado de un proceso de adaptación de la especie con el paso de los años. Contrario a eso, la introducción de esta especie en el país se dio gracias a un grupo de empresarios que apostó por el potencial de estos animales trayéndolos a suelos venezolanos (Gómez, 2017). Así pues, en el año 1920, el general Juan Vicente Gómez importó los primeros ejemplares; siendo de estos 26 hembras y 2 machos, los cuales se introdujeron en el sistema productivo donde hasta hoy día se estima un aproximado de más de un millón de cabezas (Montiel, 2008).

De acuerdo con lo anterior, las principales razas de búfalos en Venezuela son: Mediterránea y Murrah, donde esta segunda cuyo nombre quiere decir “espiral” refiriéndose a la forma de sus cuernos es originaria de la india y se caracterizan por tener un cuerpo grande y macizo, con piel negra y cuernos cortos, los machos promedian los 800 kilos de peso y las hembras los 650 kg, se caracteriza por ser buena lechera, produciendo entre 1.500 y 4.000 litros en lactancias de 300 días (Alves, 2010). En cuanto a la raza Mediterránea, tiene su origen en Italia y se distinguen por ser de color negro, gris o marrón, el cuerpo es ancho en relación al largo, con patas cortas y robustas; los cuernos son medianos dirigidos hacia atrás, con las puntas

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR

curvadas hacia arriba y adelante, los machos pesan 800 kilos y las hembras 600, en promedio y producen entre 1.800 y 2.700 litros de leche en 250 días de lactancia (Alves, 2010).

Por ende, en el presente trabajo se presenta una recopilación de información sobre la PIV de embriones en búfalas que se llevó a cabo en la zona de Santa Bárbara del Zulia en Venezuela, buscando despertar el interés de esta práctica en la especie bufalina, teniendo en cuenta que su aplicación hoy día no es muy común; aún con la facilidad que brinda la tecnología y los avances médicos que se han venido desarrollando en esta área de estudio.

2.2 Revisión bibliográfica

2.2.1 Desarrollo del folículo y del ovocito

Durante la vida embrionaria los ovocitos son almacenados en los ovarios, donde se garantiza que en el transcurso de la vida reproductiva del animal se dé el crecimiento de los folículos de forma cíclica y a su vez garantizar la ruptura y liberación del ovocito para el momento de su fecundación (Rodríguez, 2013).

De igual importancia, en el periodo fetal se da el desarrollo de los folículos y los ovocitos los cuales se originan en las denominadas células germinales primordiales (CGPs), que derivan de la masa celular interna del blastocisto en desarrollo, las CGPs migran hasta las crestas gonadales, las que a medida que el embrión se desarrolla, conformarán los futuros ovarios. El número de ovocitos que se forme durante este desarrollo fetal va a constituir la cantidad máxima disponible de la hembra en su vida reproductiva, a medida que la hembra va aumentando su edad estos van disminuyendo sin nunca renovarse (Rodríguez, 2013).

Así pues, el comienzo de la división celular concuerda con el inicio de la foliculogénesis, esto se da cuando el ovocito está recién diferenciado se asocia con un grupo de células del estroma que pasan a denominarse células foliculares dando lugar a los folículos primordiales, los que más adelante por estímulos intrínsecos se transforman en folículos primarios (Castañeda, 2009). Una vez que el ovocito comienza a crecer, las células de la granulosa inician su multiplicación, trabajando de forma sincrónica el uno con el otro a medida que se van diferenciando, donde el ovocito se encarga del crecimiento folicular, así como de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, y estas se ocupan del crecimiento, la diferenciación y maduración del ovocito. En el momento que el ovocito se encuentra envuelto

por dos o más capas de las células de la granulosa, se habla de folículo secundario con la formación de dos estructuras que son la teca interna y la zona pelúcida (Rodríguez, 2013).

Conforme progresa el desarrollo folicular, entre las células de la granulosa aparecen unas pequeñas vesículas las cuales convergen entre sí pasando a formar una cavidad denominada antro; momento en que el folículo pasa a llamarse folículo antral, que es la etapa final de la foliculogénesis. En el interior de este se encuentra un ovocito rodeado de varias capas de células que reciben el nombre de células del cúmulo, donde la capa más interna se denomina corona radiada (Filipiak & Bielli, 2016).

2.2.2 Fluido folicular

El fluido folicular es un trasudado procedente del plasma que se encarga de nutrir al ovocito, mientras va determinando el ritmo del crecimiento folicular y desarrollo ovocitario previo a la ovulación (Seco, 2020). Este se compone de electrolitos, proteínas, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, entre otras sustancias aún indefinidas. Entre unas de sus funciones está bloquear la meiosis, protección frente a la proteólisis, expulsión durante la ovulación y estimulación de la motilidad y de la reacción acrosómica (Rodríguez, 2013).

La mayoría de los folículos que se forman están destinados a degenerarse naturalmente, suceso controlado hormonalmente que se conoce como atresia folicular y lleva a la disminución gradual de la cantidad máxima de ovocitos desde la etapa fetal hasta la senescencia sexual, igualmente teniendo así los folículos dos alternativas: la atresia folicular por proceso apoptótico o su desarrollo completo hasta el momento de la ovulación (Rodríguez, 2013).

2.2.3 Producción in vitro de embriones

Durante el transcurso de los años se han realizado esfuerzos para reproducir artificialmente los eventos de la fertilización desde el ámbito investigativo hasta la entrada en el campo, con fines económicos y productivos. De modo que se han llevado a cabo innumerables experimentos relacionados con las tres etapas principales de la PIVE: maduración in vitro (MIV) de ovocitos, fecundación in vitro (FIV) de gametos y cultivo in vitro (CIV) del cigoto, del que dependerá finalmente el éxito o el fracaso de todo este proceso en conjunto (Mucci et al., 2006).

De este modo, la PIVE hace parte de las biotecnologías reproductivas que brinda la posibilidad de producir embriones in vitro a bajo costo, entre otras ventajas como la reproducción de animales de alto valor genético y total aprovechamiento de sus ovocitos obteniendo mayor número de crías de una misma donante en el transcurso de su vida. Por otro lado, permite también obtener descendencia de animales que deben ser sacrificados, con problemas reproductivos o de avanzada edad (Mucci et al., 2006).

2.2.4 Colecta y selección de ovocitos

Las hembras bovinas al nacer poseen 75.000 óvulos en cada ovario, Sin embargo, solo se obtienen de 4 a 5 crías por animal en el transcurso de su vida (Smeaton et al., 2003). En relación con esto, se pueden estar perdiendo hembras con alto valor genético, por lo que con la colecta de ovocitos inmaduros se busca el aprovechamiento de estos animales antes de ser descartados o de su muerte; preservando su genética con la PIVE obtenidos de dichos ovocitos (Gonella et al., 2013).

Así pues, en un ciclo estral normal el número de ovocitos se determina por la dinámica folicular al momento de la aspiración, donde de acuerdo con la teoría de desarrollo folicular en ondas, el número de folículos presentes en el ovario va a depender del día del ciclo estral en el

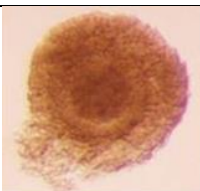
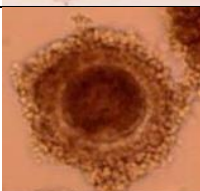
INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR

que se encuentre el animal (UNAM, 2021). De este modo, las búfalas se caracterizan por presentar de una a tres oleadas foliculares, con predominio de ciclos de dos ondas (Sánchez et al., 2019).

Entre tanto, la colecta de los ovocitos se puede realizar mediante dos formas: por OPU o con ovarios recuperados de la planta de beneficio, la OPU consiste en puncionar los folículos de hembras vivas para la obtención de los ovocitos mediante aspiración guiada por ultrasonografía; generalmente se hace uso de un transductor convexo, por su facilidad y eficiencia en la fijación y el cambio de posición del ovario, así como una mejor apreciación de folículos pequeños en comparación con el transductor lineal, así pues esta técnica es posible realizarla en cualquier momento del ciclo estral (Rivera, 2019). En cuanto a la recolección de ovocitos obtenidos de ovarios provenientes de la planta de beneficio, permite obtener crías viables, aun cuando la donante ha sido sacrificada, estos se transportan al laboratorio y allí se realiza el mismo proceso de aspiración o haciendo cortes horizontales del ovario, recolectando su contenido (Quispe et al., 2018).

Por otro lado, la selección de ovocitos para su posterior maduración abarca una evaluación morfológica visual de las estructuras, basándose en un criterio de clasificación utilizado universalmente, el cual considera dos características principales: Las células del cumulus; número de capas de células y compactación de las mismas y apariencia del citoplasma (UNAM, 2021). Esto permite que haya una clasificación de los ovocitos en cuatro grados según su morfología (Tabla 1), donde los grado I y grado II se consideran aptos para el proceso de maduración in vitro.

Tabla 1*Clasificación de ovocitos*

	Grado I. Gran potencial de desarrollo embrionario, cubierto por 4 o más capas de células del cumulus adheridas a la zona pelúcida, ooplasma oscuro, finamente granulado y homogéneo.
	Grado II. Con 3-5 capas de células del cumulus, ooplasma totalmente granulado y oscuro, 3l 40% de estos comienzan el clivaje después de la fertilización y el 8% desarrollan embriones.
	Grado III. Desnudos, con 1-2 capas de células del cumulus, citoplasma granulado irregular y vacuolado, el 38% desarrolla clivaje y <1% se desarrolla hasta blastocito.
	Grado IV. Son aquellos ovocitos desnudos y/o con citoplasma heterogéneo.

Nota: Clasificación de los CCOs de acuerdo con la morfología visual de las estructuras, de la calidad del citoplasma y de las células del cumulus. Fuente: (UNAM, 2021)

2.2.5 Medio de cultivo

Existen diversas clases de medios de cultivo que intentan simular los nutrientes y componentes que se encuentran en el tracto reproductivo de la hembra, los principales parámetros para obtener un medio de cultivo óptimo son:

2.2.5.1 Osmolaridad

Basándose en las secreciones uterinas, lo ideal sería una osmolaridad de 280 ± 20 mOsm/Kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/Kg favorecen el desarrollo embrionario (Mucci et al., 2006).

2.2.5.2 pH

En la mayoría de las producciones in vitro de embriones mamíferos estos desarrollan un pH neutro o ligeramente alcalino, pudiéndose considerar 7,2 y 7,6 un pH idóneo (Mucci et al., 2006).

2.2.5.3 CO₂ y O₂

La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO₂ en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ para el desarrollo embrionario. Valores similares a los contemplados en el oviducto de algunas hembras mamíferas (Mucci et al., 2006).

2.2.5.4 Fluido oviductal

Siendo el bovino el mamífero que más se asemeja al búfalo, respecto a esta especie se plantean bajos niveles de sodio (Na) y altos niveles de potasio (K), comparados con los niveles plasmáticos. Así como: magnesio (Mg), calcio (Ca), bicarbonato (HCO₃), sulfatos y fosfatos (Mucci et al., 2006).

2.2.5.5 El agua

Es el componente con mayor proporción en cualquier medio de cultivo, por lo que su grado de pureza debe ser alto, ya que está estrechamente relacionado con el desarrollo embrionario (Mucci et al., 2006).

El grado de pureza del agua puede ser controlado mediante la determinación de su resistencia al paso de la corriente eléctrica, cuanto mayor sea esta, mayor será su pureza; la mayor resistencia ofrecida es 18,3 megaohms-cm a 25°C (Mucci et al., 2006).

2.2.5.6 Fuente de energía

Las fuentes de energía más utilizadas en medios de cultivo para el embrión durante los primeros estadios son, en general, el lactato, el piruvato y la glucosa. En el caso de la glucosa, a partir del estadio de 8-16 células es primordial para la compactación, la formación y expansión del blastocelo; donde el cociente ATP-ADP puede disminuir provocando la inhibición sobre la enzima fosfofructoquinasa la cual acelera la glucólisis generándose un aumento en el consumo de glucosa (Mucci et al., 2006).

2.2.5.7 Fuente de proteína

Aminoácidos. Entre las fuentes de proteína más importantes se encuentran los aminoácidos que son utilizados como fuente de energía, como buffer intracelular manteniendo el pH constante y para la síntesis de proteínas, siendo incorporados por transportadores de membrana específicos regulados en función del estadio de desarrollo o en respuesta a señales externas (Mucci et al., 2006).

Se ha comprobado que los aminoácidos no esenciales propician al desarrollo del embrión en estadios tempranos; las células trofoblásticas que dan origen a la placenta fetal lo utilizan junto con la glutamina, de mismo modo, los aminoácidos esenciales favorecen el desarrollo en embriones de más de ocho células teniendo preferencia de elección la masa celular interna que origina al feto (Mucci et al., 2006).

Macromoléculas. Las macromoléculas más empleadas frecuentemente en el cultivo embrionario incluyen la albúmina sérica bovina (BSA) y el suero fetal bovino (SFB). Estos agregados mejoran la maduración y desarrollo embrionario, debido a que facilitan el transporte

de fluidos a través de la membrana celular, favoreciendo la expansión de las células del cumulus y la producción de factores que promueven el reinicio de la meiosis (Cruz et al., 2014).

El SFB es una mezcla de compuestos como glucosa, proteínas, vitaminas, oligoelementos y hormonas que favorecen el crecimiento y adhesión celular (Simancas & Vergara, 2018). Igualmente, la BSA es una proteína plasmática que puede unirse a sustancias como ácidos grasos, hormonas, enzimas, entre otras., y transportarlas en sangre hasta sus órganos blanco (Mucci et al., 2006), estas dos macromoléculas además de aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas protegen al embrión en cultivo de sustancias tóxicas (Durán, 2022).

2.2.6 Maduración in vitro

La maduración in vitro (MIV) consiste en obtener ovocitos inmaduros a partir de folículos ováricos que podrán ser madurados fuera de su ambiente natural, bajo condiciones de laboratorio en medios específicos (Vargas et al., 2012). Por su parte, Lonergan & Fair (2016) destacan que: La maduración ovocitaria es el acontecimiento fisiológico que precede y es necesario para el éxito de la fertilización y desenvolvimiento embrionario.

Con respecto a lo anterior, la mayoría de los mamíferos se encuentran en estadio de profase I, esperando una estimulación que la da ciertos factores de crecimiento y hormonas, llevando a estos ovocitos al estadio de MII (Moor, 2020). Así pues, en bovinos se necesitan de 20 a 24 horas para que se dé la maduración nuclear (Lonergan & Fair, 2016), donde el ovocito progresa desde el estadio de profase de Metafase I hasta el de Metafase II, permaneciendo en esta hasta el momento en que es fertilizado; allí se completa la meiosis y se forman los pronúcleos (Moor, 2020). A su vez, en el ovocito se debe dar también una maduración citoplasmática que le va a permitir resistir al proceso de fertilización, al mismo tiempo que aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo embrionario temprano (Peláez, 2011).

Además de esto, las condiciones físicas en las que maduran los ovocitos, así como el medio de maduración a usar van a tener una gran influencia en el resultado final (UNAM, 2021). Una vez que se completa el período de incubación de la MIV, los ovocitos maduran al desprenderse del primer corpúsculo polar quedando preparados para la fecundación (Silva et al., 2017).

2.2.7 Fecundación in vitro

Una vez finalizada la MIV y teniendo los espermatozoides previamente capacitados, se debe adecuar el ambiente para la fecundación; propiciando el adecuado metabolismo de las células del cúmulo y del ovocito, manteniendo a su vez la función espermática eficiente (Gonella et al., 2013). Asimismo, la fertilización es el proceso en que el ovocito y el espermatozoide, ambos con un único conjunto de cromosomas (haploide), interactúan entre sí y se fusionan para formar un cigoto con un conjunto diploide de cromosomas (2n) (UNAM, 2021). Por tanto, para que se pueda llevar a cabo esta fusión de gametos, se debe dar la interacción espermatozoide-zona pelúcida, donde los espermatozoides reconocen la ZP para posteriormente atravesarla y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Hamamah et al., 2009).

Igualmente, en la fecundación se puede presentar la polispermia, la cual es una anomalía en donde más de un espermatozoide puede penetrar al ovocito, generalmente debido al uso de ovocitos inmaduros que expresan una incorrecta exocitosis impidiendo la óptima dispersión de los gránulos corticales, lo cual facilita la penetración de la ZP (Izquierdo, 1996). Para evitar esto, naturalmente se da el bloqueo vitelínico; que consiste en la despolarización rápida de la membrana plasmática del ovocito, lo cual impide la penetración de más de un espermatozoide, una vez concluido el proceso de fecundación, los cromosomas paternos y maternos se asocian

iniciando la formación del cigoto (Gonella et al., 2013); el cual ya cuenta con un genoma nuevo y está listo para pasar a la etapa de incubación (Vargas et al., 2022).

2.2.7.1 Capacitación espermática

Normalmente los espermatozoides eyaculados no pueden fecundar el óvulo hasta que hayan permanecido en el tracto reproductivo de la hembra un tiempo determinado. En el bovino el espermatozoide necesita alrededor de cuatro horas para alcanzar la capacitación y así lograr penetrar al ovocito, para realizar la capacitación de los espermatozoides in vitro, debe usarse un medio el cual suministre electrolitos y energía de manera limitada, con metabolitos como la glucosa, piruvato y lactato lo que favorece la alta disponibilidad de ATP necesario para la motilidad y otros procesos (Vargas et al., 2022).

Por consiguiente, entre las técnicas más utilizadas para capacitar los espermatozoides, basándose en el movimiento de este desde el semen hasta el medio de cultivo son: la técnica de lavado, “Swim Up” y gradientes de densidad, este último es el que se lleva a cabo en este caso, ya que permite separar el espermatozoide en sus componentes de acuerdo con la densidad de los mismos usando el principio de centrifugación (Vargas et al., 2022).

Por otra parte, una de las principales alteraciones que sufre el espermatozoide en este proceso es el cambio bioquímico en su membrana plasmática, con una variación en el movimiento del flagelo espermático, proceso conocido como “hiperactivación espermática”, esto le permitirá más adelante fusionar la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, los espermatozoides ya capacitados son los únicos capaces de atravesar las células del cumulus, para así poder unirse y atravesar también la ZP alcanzando el espacio perivitelino, en donde la cabeza espermática se va a adherir firmemente a la superficie del ovocito dándose la fusión de

las membranas de ambos gametos; esta fusión genera la activación del ovocito mediante una cascada de señales de transducción que dan lugar a un cigoto diploide, momento en que se retoma la meiosis para la posterior transformación del ovocito en un embrión capaz de desarrollarse (UNAM, 2021).

2.2.8 Cultivo *in vitro*

Los embriones que resultan de la FIV de 4 o más células, deben pasarse a un medio de cultivo embrionario donde continuarán con su división celular a 8, 16 y 32 células (Durán, 2022). De este modo, el cultivo de embriones corresponde a la etapa más larga del proceso, donde se determina finalmente la eficiencia de cada paso y la calidad de los embriones obtenidos siendo de gran importancia las condiciones de las que debe disponer el medio de cultivo (Ramirez, 2020).

Los medios utilizados para el cultivo *in vitro* en bovinos se clasifican en tres categorías: indefinidos, haciendo uso de suero y cocultivo con células somáticas; los semidefinidos es donde el suero se sustituye por albúmina sérica y se omite el cocultivo; y definidos, cuando el suero es reemplazado por una macromolécula como PVA o PVP (Durán, 2022).

De la misma forma, la presión de oxígeno que encuentran la mayoría de los embriones mamíferos en el tracto reproductivo está entre el 3,5 y el 8%, por lo que al ser cultivados *in vitro* se debe asemejar lo mayor posible a esta misma condición (Gonella et al., 2013). En la mayoría de los laboratorios, las condiciones que se utilizan para conseguir este ambiente son medios como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc.), antioxidantes (glutación, cisteamina, cistina), factores de crecimiento y macromoléculas (suero, albúmina), en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 38,5°C y humedad a saturación (Durán, 2022). Con respecto a ello, el objetivo del cultivo *in vitro* es permitir que los ovocitos previamente fertilizados se

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR

desarrollen hasta un estadio embrionario de mórulas y blastocistos donde estarán aptos para ser transferidos a una hembra receptora (Gonella et al., 2013).

CAPITULO III

3.1 Metodología

3.1.1 Estudio correlacional de variables

3.1.1.1 Estudio de campo

Se basa en un estudio que permite la recopilación de datos de la realidad, refiriéndose a “campo” al estar presente en el lugar de los hechos. Este brinda la posibilidad de estudiar los fenómenos tal como se presentan en su contexto natural (Eugenia, 2022).

3.1.1.2 Estudio descriptivo

En este tipo de estudio se recolecta la información sin manipular las variables que pueden influir en el lugar original del objeto de estudio. Así mismo, se define como “cualquier estudio que no es verdaderamente experimental” (Eugenia, 2022).

3.1.1.3 Estudio no experimental

Este estudio se realiza sin la manipulación deliberada de las variables. Básicamente, se basa en observar los fenómenos en su contexto natural y luego analizarlos (Marisela, s.f.).

3.1.2 Población total

Para la aspiración en animales vivos se reunió un lote de 40 búfalas de las razas Murrah y Mediterránea mezcladas entre sí; para la recolección de ovarios procedentes de la planta de beneficio, se seleccionaron 6 búfalas destinadas al sacrificio que se realiza semanalmente.

3.1.3 Muestra

De las 40 búfalas reunidas en total, se escogieron 17 de estas, las 6 hembras con destino a planta de beneficio todas se incluyeron en la muestra; de este modo, recolectando un total de 12 ovarios.

3.1.4 Variables

Para la selección de los animales a aspirar en vivo se tuvieron en cuentas variables como:

- Búfalas con promedio de 56 meses de edad.
- Condición corporal entre 2.5 y 3.5.
- Donadoras con buenos antecedentes reproductivos; sin problemas en los partos, sin registro de abortos o retención placentaria y libres de enfermedades.
- Índices de producción láctea con un promedio de 6 litros de leche/día.
- Tamaño ovárico superior a 1.5 cm de longitud.
- Tamaño folicular igual o mayor a 2 mm y capacidad de manipulación del ovario por parte del aspirador.

Para el caso de las búfalas destinadas a la planta de sacrificio, se trató de animales que presentaban:

- Condición corporal entre 2.0 y 3.0.
- Libres de cualquier patología.
- Con registros de producción láctea menor a 5 litros de leche/día y presencia de un pezón de más o alteraciones en la morfología de estos.
- Al momento de la aspiración folicular se consideraron todos los ovarios, y folículos de 1 mm o mayor a este.

3.1.5 Recolección de ovocitos

La extracción de ovocitos en las búfalas de raza Murrah y Mediterránea se llevó a cabo de dos formas:

1) Por medio de recolección individual mediante OPU realizada en 17 búfalas, la cual consistió en efectuar una aspiración folicular en animales vivos en este caso a cada una de las hembras donantes; realizando una anestesia previa donde se aplicó 5ml de lidocaína vía epidural, con el objeto de que el animal no presentara dolor ante la manipulación, así mismo, evitando los espasmos para mejor movilidad del aspirador. Una vez preparado el animal se procedió a puncionar los diferentes folículos que presentara el ovario con aguja calibre 18 guiada por ultrasonografía, donde a medida que se iban aspirando, estos se depositaban en un tubo tipo falcon de 50ml precalentado a 37°C para su posterior transporte al laboratorio.

2) Por recolección de ovarios provenientes de la planta de beneficio, donde se obtuvo un total de 12 ovarios de las búfalas donantes destinadas a sacrificio. Los ovarios se recuperaron en la planta de beneficio y se transportaron al laboratorio en una cava portátil con agua a temperatura de 37°C, una vez allí, los ovocitos se recuperaron de los folículos mediante aspiración con aguja de calibre 18.

En los dos métodos aplicados, a medida que se iban recolectando los ovocitos, estos se pasaban a tubos de centrífuga de 5ml los cuales contenían solución salina al 0,9%, alcohol de polivinilo (PVA) (4ml/L), penicilina benzatínica (0,03 g) y heparina (0,22-0,5 ml). Solución que debía estar a una temperatura de 37.5°C, con la ayuda de un calentador de tubos, para posteriormente ser transportados en el menor tiempo posible al laboratorio.

3.1.6 Maduración *in vitro*

En esta fase, la solución mencionada anteriormente se vertió en un filtro logrando que solo quedaran los ovocitos en el fondo de este; se posicionó el filtro sobre una placa de Petri de 60 mm con solución salina al 0,9% en su interior haciendo que los ovocitos quedaran dispersos en la solución, todo esto sobre una platina térmica para mantener la temperatura adecuada.

Posterior a eso, se pasó el contenido aspirado a una placa de Petri de 60mm previamente rayada con líneas verticales al microscopio para realizar una búsqueda en zigzag de los ovocitos; en donde se seleccionaron los ovocitos de grado I y grado II con una micro pipeta y se trasladaron a un tubo Eppendorf el cual contenía 1 ml de medio de maduración, repartidos 975 μ L de TCMcultivo y 25 μ L de suigonan (gonadotropina coriónica); una vez en este, se ingresó el tubo a incubar de 22 a 24 horas a una temperatura de 39°C y 5% de CO₂.

3.1.7 Fertilización in vitro

1 hora antes de finalizar el tiempo de maduración in vitro, se preparó el medio de cultivo para la fertilización in vitro; correspondiente a la mezcla del medio Fert-Talp (4,5 ml) + APG (albúmina-piruvato-gentamicina) (500 μ L) + HHE (hipotaurina-heparina-epinefrina) (50 μ L), adicionando aceite para evitar la evaporación, dejándolo en la incubadora a 38°C y 5% de CO₂, esto con el fin de estabilizar el medio.

Como segundo paso se pasó a realizar la capacitación espermática usando BoviPure (Gradiente de densidad) en donde se prepararon dos soluciones: la primera al 40%; mezclando 300 μ L Bovidilute + 200 μ L BoviPure y la segunda al 80%; mezclando 100 μ L Bovidilute + 400 μ L BoviPure. Una vez obtenidas las dos soluciones, se dispuso la solución BoviPure al 40% sobre la solución al 80% en un tubo Eppendorf.

Seguido a esto, se continuó descongelando la pajilla de semen a usar por un minuto a 30°C. Una vez descongelado, se colocó una capa de semen sobre la mezcla de BoviPure y se pasó a centrifugar a 300 x g durante 10 minutos con el fin de aislar y purificar los espermatozoides. Se retiró el sobrenadante, dejando aproximadamente 50 μ L de sedimento al que se le adiciono 750 μ L de Fer-Tap-APG y se pasó a centrifugar a 400 x g durante 3 minutos para lograr lavar el sedimento; se repitió este paso dos veces, adicionándole HHE en la segunda

ocasión; finalmente, se dejaron entre 50 a 70 μL de sobrenadante y se pasó el tubo a la incubadora.

Una vez ya capacitados los espermatozoides, se continuó el proceso con los ovocitos, los cuales se pasaron a gotas de lavado con *Fert-Talp* organizadas de a tres alícuotas en una caja de petri de 60 mm, donde se iban movilizando desde la primera hasta la última. Se trasladaron los ovocitos al medio de fertilización y se les añadió de 4 a 7 μL de semen por cada 25 ovocitos, pasando a incubar de 18 a 20 horas a 39°C y 5% de CO₂.

3.1.8 Cultivo *in vitro*

Se inició con la preparación y pre-incubación de las placas una hora antes, se transfirieron los cigotos a una placa de Petri con TCMair, donde se desnudaron por medio de pipeteo, y a su vez se retiraron las células del cúmulo restante con una pipeta. Teniendo ya los cigotos desnudos, se pasaron a gotas de lavado con medio SOFaa y se posicionaron de 5 a 8 cigotos por gota de medio de cultivo. Por último, se le adiciono aceite al medio y se pasó a incubar a 39°C y 5% de CO₂, donde se dejaron de 7 a 8 días hasta completar su división celular hasta la etapa de blastocito.

CAPITULO IV

4.1 Resultados

Para los resultados obtenidos, fueron aspirados 46 ovarios de los cuales se recolectaron 286 COCs; 180 mediante OPU (Tabla 2) y 106 de ovarios obtenidos de la planta de beneficio (Tabla 3), los cuales se clasificaron para ser cultivados in vitro dejando solo los ovocitos grado I y grado II siendo los únicos aptos para este proceso.

Tabla 2

Cantidad de ovocitos OPU

Donadora	Total Ovocitos Recolectados	Ovocitos Cultivados In Vitro	# Presuntivos zigotos día 3	# Presuntivos zigotos 7-8
No. 1	15	15	11	4
No. 2	15	14	11	7
No. 3	15	15	5	2
No. 4	15	14	5	1
No. 5	13	9	8	3
No. 6	12	11	10	6
No. 7	2	1	0	0
No. 8	7	7	3	2
No. 9	17	16	9	3
No. 10	10	9	2	0
No. 11	15	13	9	4
No. 12	5	2	1	0
No. 13	11	9	4	1
No. 14	9	9	4	2
No. 15	8	8	3	3
No. 16	5	5	2	0
No. 17	6	2	2	0

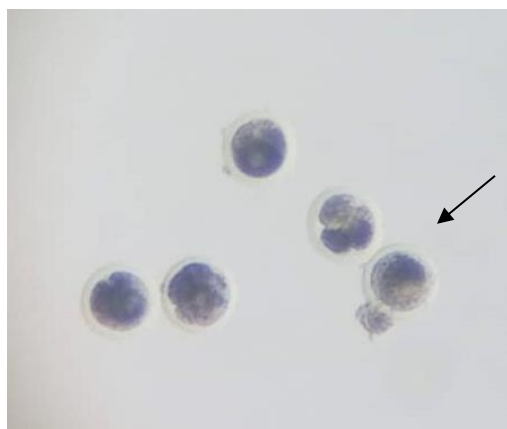
Nota: En esta tabla se muestra la cantidad de ovocitos viables observados en diferentes días obtenidos mediante OPU. Fuente: Elaboración Propia (2023)

Tabla 3*Cantidad de ovocitos planta de beneficio*

No. De Ovarios	Total Ovocitos Recolectados	Ovocitos Cultivados In Vitro	# Ovocitos Dia 3	# Ovocitos Dia 7-8
No. 1	7	7	5	2
No. 2	5	2	2	1
No. 3	13	9	5	3
No. 4	11	9	6	4
No. 5	15	10	8	4
No. 6	5	4	2	0
No. 7	7	5	2	2
No. 8	9	8	4	2
No. 9	11	8	6	5
No. 10	8	5	3	1
No. 11	6	4	2	0
No. 12	9	7	5	2

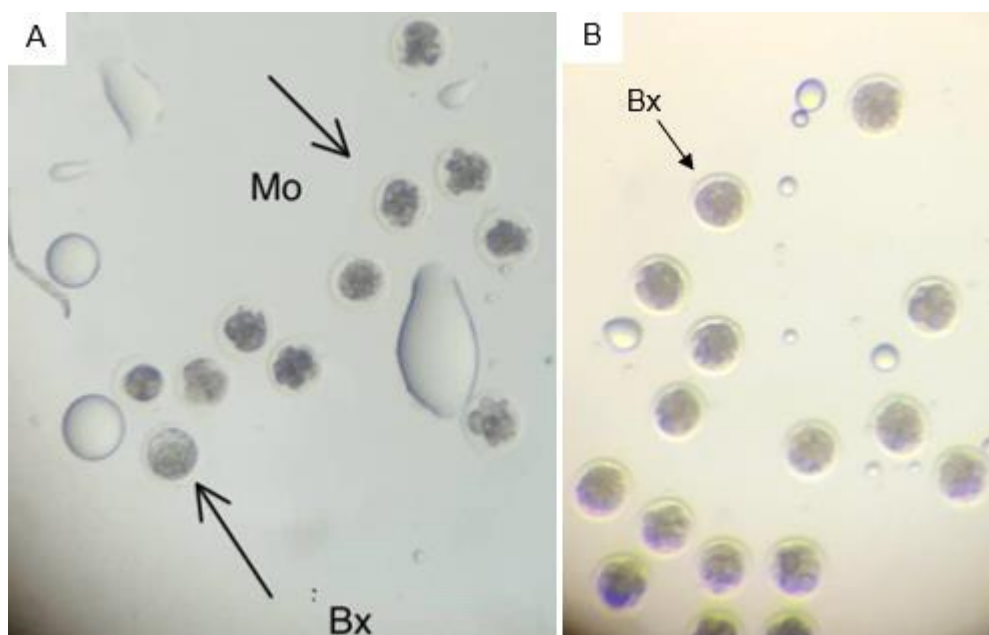
Nota: En la tabla anterior se muestra la cantidad de ovocitos viables observados en diferentes días obtenidos a partir de ovarios provenientes de la planta de beneficio. Fuente: Elaboración Propia (2023)

Al día 3 se evaluó los posibles cigotos que iniciaron la división celular con presencia de 4-8 células (Figura 1). Finalmente, al día 7 y 8 se observaron el total de cigotos que lograron su desarrollo final a blastocito y así mismo, los que se quedaron en etapa de mórula (Figura 2).

Figura 1*Embrión día 3*

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR

Nota: En la figura 1 se observa señalado el embrión en el día 3, con presencia de 4 células aproximadamente. Fuente: Elaboración propia (2023)

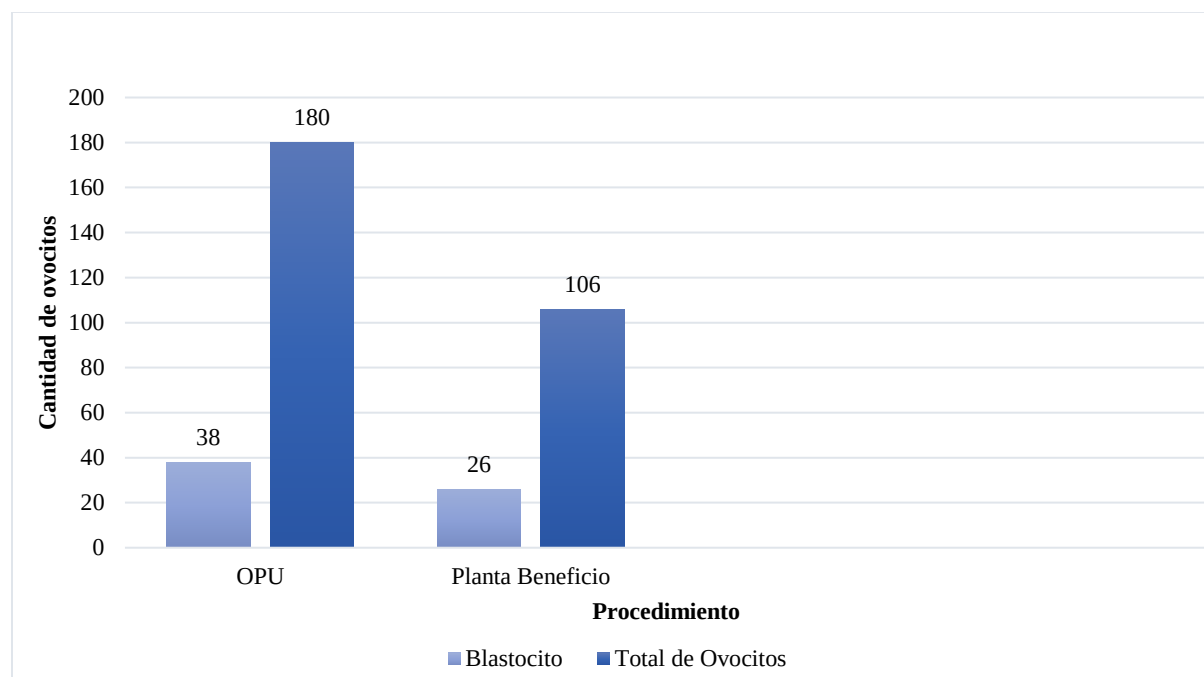
Figura 2*Embrión día 7-8*

Nota: En la figura 2 se observa el embrión en el día 7-8, donde se evidencia en la imagen A) la formación de mórulas (Mo) con presencia 16 a 32 células, y en la imagen A y B) los embriones que lograron su desarrollo final a blastocito (Bx). Fuente: Elaboración propia (2023)

En la Figura 3, se puede observar la cantidad de blastocitos obtenidos mediante los dos sistemas de recolección de ovocitos. Donde por medio de OPU, de los 180 ovocitos recolectados se desarrollaron 38 hasta la etapa de blastocito representando un 21,1% del total; mientras que, de los ovarios provenientes de la planta de beneficio, de los 106 ovocitos recolectados en total, 26 se desarrollaron hasta la etapa de blastocito representando un 16,3%. En total de los 286 COCs iniciales, se obtuvo un 22,3% de embriones en etapa de blastocitos.

Figura 3

Cantidad total de ovocitos desarrollados a blastocito



Nota: En la anterior figura se muestran la cantidad total de ovocitos desarrollados a blastocito mediante los dos sistemas de recolección. Fuente: Elaboración propia (2023)

4.2 Discusión

Distintos factores pueden influir en el número de ovocitos recolectados, tales como los tratamientos hormonales, el número de aguja de punción, la frecuencia de la aspiración, la resolución del equipo utilizado, el tamaño de los folículos y la raza (Merton et al., 2003). En este caso se recolectaron ovocitos de hembras de la raza Murrah y Mediterránea que no estuvieran bajo ningún tratamiento hormonal, donde se puncionaron folículos mayores o igual a 2 mm, todos con aguja de calibre 18; en el caso de los ovarios obtenidos de la planta de beneficio, los folículos puncionados iban de 1 mm en adelante. Obteniendo como mayor cantidad 17 ovocitos recolectados hasta un mínimo de dos ovocitos recolectados por animal.

Igualmente, Gonella., et al (2013) mencionan que uno de los mejores métodos para la recolecta de ovocitos de una forma menos traumática e invasiva es por medio de la OPU ya que esta misma no requiere una estimulación hormonal y se puede asistir de forma rápida, además de esto también garantiza una obtención de un número más elevado que por otro tipo de métodos utilizados. Mientras que, por otro lado, Nagano (2019) indica que los ovocitos recuperados de la planta de beneficio son de mejor calidad y mayor cantidad en comparación a los recuperados por OPU. Con respecto a los resultados obtenidos, en este trabajo se obtuvo un mayor número de ovocitos por ovario en los recuperados de la planta de beneficio a comparación de la técnica de OPU. Debido a que los primeros mencionados están exentos de factores que limitan su calidad como la presión de vacío y el diámetro de la aguja utilizados durante la aspiración (Quispe et al., 2018). Adicionando el hecho que mediante la recolección por OPU el manejo con el ovario se hace más dificultoso para el aspirador, ya que el animal puede presentar distintas características como cuernos uterinos muy enrollados, poca movilidad del aparato reproductor u ovarios muy fijos al mesovario lo que impide su correcta manipulación y rotación.

De acuerdo con Mucci et al., (2006) determinan que dentro del proceso de producción de embriones de bovinos se debe procurar realizar este mismo en condiciones óptimas y utilizando los elementos que propicien los resultados positivos, en esta medida se detalla que el uso de sueros permite la calidad de la composición química necesaria para la producción de óvulos y desarrollo embrionario eficaz especialmente en los primeros estadios del mismo. De acuerdo con esto, se logró evidenciar dentro del presente proyecto que el uso de suplementos proteínicos como lo fueron el Fert-Talp (4,5 ml) + APG (albúmina-piruvato-gentamicina) (500 µL) + HHE (hipotaurina-heparina-epinefrina) (50 µL), propiciaron la obtención de los ovocitos cultivados, así como su supervivencia.

De igual forma Murillo (2016) demuestra que otro aspecto fundamental dentro de las condiciones óptimas para el desarrollo embrionario se encuentra la temperatura, donde estos ovocitos deben permanecer en una incubadora con temperatura constante cercana a los 39°C por 22 a 24 horas, además de esto, también, se debe procurar que en atmósfera exista 5% de CO₂ con aire y humedad saturada, para permitir que no haya pérdidas dentro del proceso productivo; en relación con lo reportado en la literatura, se realizó dentro del presente proyecto la adecuación del ambiente idóneo para el cultivo de los ovocitos donde se ingresaron en un tubo a incubar de 22 a 24 horas a una temperatura de 39°C y 5% de CO₂ dando correspondencia a lo que muestran ciertos autores como el anteriormente mencionado.

Por su parte, Merton et al., (2003) aseguran que existen diversos factores que influyen dentro del proceso de desarrollo embrionario a través de este tipo de fertilización in vitro, como lo puede ser la edad de los animales, las razas, así como los procedimientos de recolección de ovocitos y el toro de referencia utilizado, esto igualmente se encuentra relacionado con respecto a la comparación de los sistemas o laboratorios OPU-IVP, donde se detalla que aquellos

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR

provenientes de plantas de beneficio se logra obtener entre 15 y el 60 % de crecimiento de ovocitos en el día 7; sin embargo, dentro de los resultados fue posible evidenciar que la supervivencia de ovocitos obtenidos de la planta de beneficio no fue satisfactoria hasta el día 7 de desarrollo donde se presentaron diversas pérdidas alcanzando la etapa de blastocito solo el 16,3% del total, posiblemente por las características de las búfalas utilizadas y su condición nutricional.

Según los resultados donde se obtuvo un 22,3% de embriones en etapa de blastocito, de los 286 COCs recolectados, en comparación con otros estudios en búfalos se obtuvieron valores cercanos donde de acuerdo con Gamarra (2015) el 19% alcanzaron el estadio de blastocisto, y en bovinos con valores de 31,6% para embriones cultivados en KSOM y 29,5% para embriones cultivados en HTF modificado (Ahuja et al., 2009).

En cuanto a los medios de cultivo utilizados, es difícil establecer comparaciones con los diferentes autores, pues todos no son exactamente iguales, ya que presentan cambios en la composición de los medios y suplementos que afectan a más de un componente, por lo que las diferencias no pueden atribuirse a un solo factor (UNAM, 2021). En el presente estudio se pudo determinar que los medios de cultivo utilizados para PIVE en bovinos, fueron eficientes en la producción de blastocistos en búfalos. Lo que representa una alternativa en las técnicas de reproducción de esta especie.

CAPITULO V

5.1 Conclusión

Las producciones bufalinas se caracterizan por presentar altos índices reproductivos y con rápido desarrollo corporal, así como animales con buenas aptitudes en la producción de carne y leche. Por lo que este potencial genético puede ser multiplicado más rápidamente a través de biotecnologías como la PIVE.

Teniendo en cuenta que el periodo de gestación en la especie bufalina tiene una duración de 310 a 330 días, en el cual se tiene una cría por parto. La PIVE es una alternativa que permite la obtención de mayor número de embriones por animal, incrementando las crías en el caso de animales de alto valor genético.

Por otro lado, esta biotecnología no genera costos elevados si lo relacionamos con los resultados. Con la ventaja de que mediante la PIVE se evita la transmisión de enfermedades venéreas y otros tipos de trastornos reproductivos; que, a comparación de la especie vacuna, en las búfalas la prevalencia en los desórdenes y patologías reproductivas se dan en menor medida.

La bufalocultura ofrece ventajas competitivas a nivel productivo y de crecimiento de la economía, por lo que se debe ampliar el estudio y las prácticas de estas biotecnologías reproductivas en hatos bufalinos.

5.2 Recomendaciones

Llevar un mejor manejo del animal al momento de ingresarlo al brete, evitando el mayor estrés posible y así manipular con facilidad el tracto reproductor de la hembra al momento de realizar la aspiración mediante OPU.

5.3 Referencias

Ahuja, A., Montiel, P., & Pérez, H. &. (2009). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*, 27(3), 277-284. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692009000300007

Alves, S. (2010). El bufalo: su importancia para el futuro. *sedici.unlp*, 2-14. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/30210/Documento_completo.pdf?sequence=1

Campos, J. D., Garro, E., Jiménez, V., & Mora, G. P. (2022). Manejo reproductivo en hatos bufalinos. *Tecnología en Marcha*, 35(3), 60-72. Obtenido de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/5634/6040

Castañeda, M. (2009). Fisiología de la reproducción bovina: desde la fecundación hasta la implantación embrionaria. *Ciencia Unisalle*, 1-91. Obtenido de https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1312&context=medicina_veterinaria

Cruz, S. S., Huanca, W., & Ampuero, A. C. (2014). Uso de Macromoléculas sobre la Tasa de Maduración y Desarrollo Embrionario in vitro de Ovocitos Bovinos. *Rev Inv Vet Perú*, 25(4), 1-7. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v25n4/a06v25n4.pdf>

Durán, H. E. (2022). Efecto del KnockOut™ Serum Replacement y del Suero Fetal Bovino en el cultivo y criotolerancia de embriones bovinos producidos in vitro. *UCUENCA*, 1-66. Obtenido de

<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/40073/1/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>

Eugenia. (2022). Importancia de la investigación descriptiva + Ejemplos. Tesis y Másters México. <https://tesisymasters.mx/investigacion-descriptiva/>

Eugenia. (2022). Todo lo que debes saber sobre la investigación de campo. Tesis y Másters México. <https://tesisymasters.mx/investigacion-de-campo/>

Filipiak, Y., & Bielli, M. V. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montev.)*, 52(202). Obtenido de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092016000200002

Gamarra, F. (2015). Establecimiento de un programa de producción in vitro de embriones bufalinos (*Bubalus bubalis*) en Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 20(1), 4495-4504. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-02682015000100013&lng=pt&nrm=is&tlng=es

Gómez, O. (2017). El búfalo de agua venezolano. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 30(1), 1-8. Obtenido de <https://www.analesdenutricion.org.ve/ediciones/2017/1/art-7/>

Gonella, D., Atuesta, E., & Chacón, J. B. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(1), 1-16. Obtenido de <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/3484/ART.%2094.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gonella, D., Atuesta, J., & Bernal, S. &. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(1), 1-16. Obtenido de

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

Gutiérrez, M. y. (5 de Junio de 2012). *La Republica*. Obtenido de Los búfalos son más rentables que el ganado bovino: Agronegocios: <https://www.larepublica.co/archivo/los-bufalos-son-mas-rentables-que-el-ganado-bovino-agronegocios-2012143>

Hamamah, S., Jean, M., & Barrière, P. (2009). Interacción espermatozoide-zona pelúcida del ovocito: su importancia en la inmunoanticoncepción. *EMC-Ginecología-Obstetricia*, 45(2), 1-5. Obtenido de <https://www.em-consulte.com/es/article/218866/interaccion-espermatozoide-zona-pelucida-del-ovoci>

Huertas, N. (24 de Mayo de 2018). *BMeditores*. Obtenido de El Búfalo y su Importancia Mundial. ¿Oportunidad para la pecuaria mexicana?: <https://bmeditores.mx/ganaderia/el-bufalo-y-su-importancia-mundial-oportunidad-para-la-pecuaria-mexicana-1427/#:~:text=La%20contribuci%C3%B3n%20de%20la%20especie,destaca%20es%20la%20de%20b%C3%BAfala>.

Izquierdo, D. (1996). Cultivo de embriones caprinos producidos in vitro. . *Tesis Doctoral, Universidad autónoma de Barcelona*.

La Verdad. (16 de Marzo de 2023). *Correo del Caroni*. Obtenido de La casa de las ideas: <https://correodelcaroni.com/laboral-economia/venezuela-es-el-pais-con-mayor-ganado-bufalino-de-america/>

Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 1-16. Obtenido de <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-animal-022114-110822>

Marisela. (s. f.). *Aplicación básica de los métodos científicos. Diseño No-Experiemntal*. Sistema de Universidad virtual.

https://www.uaeh.edu.mx/docencia/VI_Presentaciones/licenciatura_en_mercadotecnia/fundamentos_de_metodologia_investigacion/PRES38.pdf

Merton, J. S., De Roos, A., Mullaart, E., Kaal, L., & Vos, P. y. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2), 651-674. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X02012463>

Montiel, N. (2008). Origen del búfalo en Venezuela. Otra alternativa de producción de leche. *Conferencias*, 1-30. Obtenido de http://www.avpa.ula.ve/congresos/memorias_xivcongreso/pdf/conferencias/montiel.pdf

Moor, A. (2020). Maduración del ovocito: momento, los folículos han completado su crecimiento y los ovocitos adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reanudar la meiosis. *Documents Mexico*, 1-66. Obtenido de <https://vdocuments.mx/11-maduracin-del-ovocito-momento-los-folculos-han-completado-su-crecimiento.html?page=1>

Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(2), 1-9. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/1730/173013748002.pdf>

Murrilo, J. (2016). Informe final de pasantia profesional en la Universidad de San Paulo. *Universidad de Pamplona*, 1-87. Obtenido de

http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/621/1/Murillo_2016_TG.pdf

Nagano, M. (2019). Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 65(3), 195-201. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6584184/>

Olivera, M., Ruiz, T., & Tarazona, A. Y. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008

Peláez, V. (2011). Producción in vitro de embriones bovinos. *Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1-86. Obtenido de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>

Quispe, C., Ancco, E., Solano, J., & Unchupaico, I. &. (2018). Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Rev. investig. vet. Perú*, 29(4), 1114-1121. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000400004&lng=es&nrm=iso

Ramirez, O. J. (2020). Formación en producción in vitro de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia. *Universidad CES*, 1-18. Obtenido de https://repository.ces.edu.co/bitstream/handle/10946/5135/RAMIREZ%20OROZCO%20_2020_%20Formacion%20en%20Produccion%20in%20vitro%20de%20embriones%20bovinos.pdf?sequence=1

Rivera, M. (2019). Cómo se hace la aspiración folicular. *Revista Genética*. Obtenido de <https://revistageneticabovina.com/biotecnologia/aspiracion-folicular/>

Rodríguez, Z. L. (2013). Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro. *Repositorio Institucional DA USC*, 1-134. Obtenido de <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/9213?show=full>

Sánchez, J., Romero, M., & Meneses, A. (2019). Dinámica folicular durante el ciclo estral natural en búfalas (*Bubalus bubalis*). *Rev Inv Vet Perú*, 30(1), 1-10. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v30n1/a30v30n1.pdf>

Seco, L. (2020). *Laura Seco embrióloga y dietista*. Obtenido de Nutriendo al ovocito (El líquido folicular): <https://lauraseco.com/nutriendo-al-ovocito-el-liquido-folicular/#:~:text=El%20l%C3%ADquido%20folicular%20es%20el,ovocito%20previo%20a%20la%20ovulaci%C3%B3n>

Silva, R., Vulcani, V., Camargos, A., Costa, U., & Dutra, M. &. (2017). Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte. *In Colloquium Agrariae*, 13, 1-14. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/20f2/54253c17e6a466985c3e20e642352184fe43.pdf>

Simancas, E., & Vergara, A. y. (2018). Influencia del suero fetal bovino en el cultivo de fibroblastos gingivales. *Av Odontoestomatol*, 34(6), 299-309. Obtenido de [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852018000600004#:~:text=El%20SFB%20es%20una%20mezcla,de%20las%20c%C3%A9lulas\(10\).](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852018000600004#:~:text=El%20SFB%20es%20una%20mezcla,de%20las%20c%C3%A9lulas(10).)

Smeaton, D., Harris, B., & Xu, Z. &. (2003). Factors affecting commercial application of embryo technologies in New Zealand: a modelling approach. *Theriogenology*, 59(2), 617-634.

Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X0201244X>

UNAM. (2021). Capítulo 23. Producción de embriones in vitro. En G. C., *Reproducción de los animales domésticos* (págs. 1-40). Mexico. Obtenido de Tratamientos Superovulatorios: <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo23/tratamientos-superovulatorios.html>

Vargas T, L., Pella C, R., & Vargas L, A. Y. (2012). Maduración in vitro de ovocitos: alternativa efectiva en reproducción asistida. *Rev. peru. ginecol. obstet.*, 58(4), 263-266. Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322012000400004#:~:text=La%20maduraci%C3%B3n%20in%20vitro%20\(MIV\)%20de%20ovocitos%20consiste%20en%20obtener,de%20cultivo%20suplementados%20con%20hormonas.](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322012000400004#:~:text=La%20maduraci%C3%B3n%20in%20vitro%20(MIV)%20de%20ovocitos%20consiste%20en%20obtener,de%20cultivo%20suplementados%20con%20hormonas.)

Vargas, P. A., Bermúdez, F. I., Cardenas, I. O., & Alpízar, J. S. (2022). Aspectos relacionados con la fertilización in vitro (FIV) en bovinos, una revisión bibliográfica. *Revista AgroInnovación en el Trópico Húmedo*, 3(1), 1-10. Obtenido de <https://revistas.tec.ac.cr/index.php/agroinn/article/view/6507>

Vilchis, J. (2011). Manual de aspiracion Folicular en Bovinos. *Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro*, 1-53. Obtenido de http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3172/2929_JUAN%20LUIS%20VILCHIS%20RAMOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20aspir

INFORME DE PASANTÍA 2023 – 1 BUFASUR

aci%C3%B3n folicular se puede, mayor en comparación con TE.