

FLUIDO UTERINO DE LLAMA (*Lama glama*), COMO MEDIO PARA POTENCIAR EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE VACAS (*Bos taurus*) EN CULTIVOS *IN VITRO*

Uterine fluid from llama (*Lama glama*) as a means to enhance embryonic development of cows (*Bos taurus*) in *in vitro* cultures

Nina, M¹; Ayala, C²; Susaño, R³

RESUMEN

Se evaluó el fluido uterino de Llama (*Lama glama*), como medio para potenciar el desarrollo embrionario *in vitro* en el ganado bovino. Se obtuvo el fluido uterino de la Llama que fue refrigerado. Se utilizaron 428 ovocitos procedentes de vacas post mortem para la FIV, en dos grupos de estudio, el primero fue con el medio de cultivo convencional y el segundo al medio de cultivo+ fluido uterino, el proceso de maduración de los ovocitos se realizó con (BO-HEPES) durante 24 horas, posteriormente fueron fertilizados (FER-TALP) por un periodo de 24 horas, la capacitación espermática fue a través de la técnica Swin-up. El proceso de incubación fue a 38.5°C, 5 % CO₂ de aire y un 95 % de humedad relativa. A las 48 horas, para el primer grupo se obtuvo un 31.40 % de división embrionaria y para el segundo 36.97 % sin encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$). Al día ocho el porcentaje de embriones con la adición de fluido uterino logró el 20.17 % en referencia al primer grupo con un 14.88 % existiendo diferencias significativas ($p > 0.05$). Los embriones fueron clasificados en cuatro categorías según IETS, para el medio de cultivo convencional se obtuvo 9.91 % excelente calidad, 19.83 % regular calidad, 24.79 % mala calidad, para el medio de cultivo enriquecido se halló 15.13 % excelente calidad, 25.21 % regular calidad, 27.73 % mala calidad, considerando que aún pueden ser transferibles. La categoría cuarta se considera como intransferible, de los cuales se obtuvo un 45.55 % para el primer grupo y para el segundo 31.39 %. La adición del fluido uterino de Llama al medio de cultivo, ha mejorado la tasa de desarrollo embrionario alcanzando hasta el estadio de blastocisto expandido, evidenciando mejoras en la calidad embrionaria en los aspectos morfológicos.

Palabras clave: Fluido uterino de Llama (*Lama glama*), blastocisto expandido, fertilización *in vitro*.

ABSTRACT

Llama (*Lama glama*) uterine fluid was evaluated as a means to enhance *in vitro* embryo development in cattle. Llama uterine fluid was obtained and refrigerated. The first was with conventional culture medium and the second with culture medium + uterine fluid. The maturation process of the oocytes was carried out with (BO-HEPES) for 24 hours, then they were fertilized (FER-TALP) for a period of 24 hours, the sperm capacitation was through the Swin-up technique. The incubation process was at 38.5°C, 5% CO₂ air and 95% relative humidity. At 48 hours, 31.40% embryo division was obtained for the first group and 36.97% for the second group, with no significant differences ($p < 0.05$). At day eight, the percentage of embryos with the addition of uterine fluid reached 20.17% compared to the first group with 14.88%, with significant differences ($p > 0.05$). The embryos were classified in four categories according to IETS, for the conventional culture medium 9.91 % excellent quality, 19.83 % regular quality, 24.79 % poor quality, for the enriched culture medium 15.13 % excellent quality, 25.21 % regular quality, 27.73 % poor quality were found, considering that they can still be transferable. The fourth category is considered as non-transferable, of which 45.55% was obtained for the first group and 31.39% for the second. The addition of Llama uterine fluid to the culture medium has improved the embryo development rate reaching the expanded blastocyst stage, showing improvements in embryo quality in morphological aspects.

Keywords: Llama (*Lama glama*) uterine fluid, expanded blastocyst, *in vitro* fertilization.

¹ Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. veramarisabel6@gmail.com

²  Docente investigador, Facultad de agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia. celsoayalavargas@hotmail.com

³ Docente investigador, Centro de mejoramiento genético UAC Batallas, Universidad Católica Boliviana de "San Pablo", Bolivia. reypc123@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas se han caracterizado por sus grandes avances durante años, en los procedimientos dirigidos a la reproducción asistida en humanos y mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales (Hansen, 2006). El empleo de estas técnicas puede implicar un importante progreso biotecnológico en la producción lechera del ganado bovino (Morales, 2017).

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

Para promover la competencia de desarrollo de ovocitos de bovino y la subsecuente calidad de los embriones se ha adicionado al fluido oviductal de vesícula extracelular del istmo (Lopera-Vásquez et al., 2017) y glucocorticoides como también la piridoxina que inhibe la actividad de la catepsina B durante la maduración *in vitro* y el cultivo *in vitro* (IVC), los dos anteriores benefician el desarrollo embrionario (Da Costa et al., 2016).

No obstante, el mayor obstáculo en el desarrollo de embriones *in vitro* en varias especies, tales como la fertilización *in vitro*, ha sido el bloqueo de las divisiones celulares que ocurre en el método de cultivo *in vitro* (Tervit et al., 1972). En el bovino el bloqueo ocurre en el estado 8 a 16 células, no permitiendo alcanzar la etapa de blastocisto (Enright, et al., 2000; Rizos et al., 2002; Galli et al., 2003; Lonergan, et al., 2004). Los blastocistos que llegan hasta esta etapa se consideran de menor calidad donde el potencial de desarrollo disminuye (Bang et al., 2015).

Los elevados costos de los materiales equipos e insumos, para realizar comercialmente los procesos biotecnológicos de la fertilización *in vitro*, limitan el desarrollo de esta técnica, es por esa razón que recurre a medios biológicos que se puedan disponer para poder garantizar dicho procedimiento, en tal

sentido el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del fluido uterino de Llama (*Lama glama*) en el desarrollo embrionario del ganado bovino para cultivos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la zona de estudio

El presente trabajo se realizó en el centro de Mejoramiento Genético del altiplano-UAC BATALLAS, se encuentra ubicado en la comunidad de Batallas, en tercera sección municipal de la provincia Los Andes; situado a 50 km de la ciudad de La Paz, Bolivia. Se encuentra geográficamente a una latitud sur de 16° 28' 51.45" y longitud Oeste de 68° 55' 02.72" y una altitud de 3 838 m s.n.m. La temperatura media del lugar es de 10°C, y cuenta con una precipitación pluvial media de 600 mm al año.

Metodología

Mediante cronología dentaria, se consideró la edad aproximada de 4 años, condición corporal 4 Buena. Animal alimentado con pasturas nativas todo el año, con buen estado sanitario. Para la colecta del fluido uterino en llamas se administró 1 ml de la hormona liberadora de gonadotropina (GNRH), por vía intra muscular. Pasado las 24 horas, se procedió a la colecta a través de la sonda Foley, se extrajo 7 uL de fluido uterino técnica se repitió unas 15 veces, se congelaron a -80°C, hasta su aplicación al medio de cultivo.

Los ovarios de bovino fueron obtenidos de 214 hembras beneficiadas en el matadero municipal de "Los Andes" El Alto, sin considerar raza ni edad, con la extracción de los ovarios derecho e izquierdo, las muestras fueron transportadas hasta el respectivo laboratorio, manteniendo la temperatura a 38°C.

La recuperación de ovocitos fue mediante la técnica de aspiración folicular de aquellos folículos que se encuentran entre 3 a 6 mm de diámetro de su desarrollo. Su contenido fue colocado en un tubo de ensayo de 10 ml una vez llenado se dejó sedimentar por 10 minutos, luego fue sacado cuidadosamente el líquido folicular con la pipeta fip adosada a una jeringa de tuberculina, dejando solo los ovocitos sedimentados en el tubo de ensayo. En una caja Petri fueron vertidos los ovocitos y lavados con el medio de lavado (Bio-Wash IVF). Mediante estereoscopio y a un aumento de 10 X, procediendo a la categorización de los ovocitos.

Para el proceso de maduración de los ovocitos se preparó y estabilizó el medio de maduración (BO-HEPES) 700 uL en forma de microgotas. Luego se procedió a su selección e introducidos al medio de maduración, bajo un medio ambiente con CO₂ e incubando a 38.5°C durante 24 horas.

Para la fertilización *in vitro* se utilizó semen congelado de raza Holstein y Pardo suizo procedente de la Estación Experimental de Choquenaira del Laboratorio de Criopreservación de Semen. La capacitación de los espermatozoides se llevó a cabo por la técnica (Swin-up). Para realizar la fertilización se verifico previamente la maduración de los ovocitos observando con el estereoscopio el grado de la expansión del cumulus ophorus.

Pasado las 24 horas los cigotos fueron retirados de la incubadora y llevados al estereoscopio y observar la formación del segundo corpúsculo polar, sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras, por esta razón se propone la formación de las primeras blastómeras como criterio (Fukui, 1990).

El medio de cultivo utilizado fue bajo la misma técnica del medio de maduración no habiendo ninguna diferencia a excepto del cambio de medio de cultivo (BO-IVC). En esta etapa se adicionó el fluido uterino de la Llama y este se mantuvo por ocho días a 38.5°C, con el 5 % de CO₂ en aire y 95 % humedad relativa.

Para los ovocitos con el medio de cultivo convencional o sin la adición del fluido uterino, la renovación del medio de cultivo se realizó cada 48 horas y para el día 8 se evaluó el porcentaje de embriones en sus diferentes estadios. La evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* se llevó a cabo el porcentaje de embriones en sus diferentes estadios con la ayuda de un estereoscopio y un microscopio a un aumento de 10 x, a las 48 horas y al día 8, registrando el número de mórulas y blastocistos.

Los datos fueron evaluados mediante comparación de proporciones con la prueba de chi-cuadrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fertilización *in vitro* bajo el medio ambiente como el Altiplano de Bolivia y considerando la altitud de 3 800 m s.n.m., son condiciones adversas que limitan el desarrollo de biotecnologías reproductivas en muchas especies de animales domésticos. Por tanto, los resultados obtenidos muestran las posibilidades de

poder concretar el uso de la fertilización *in vitro*, como alternativa para una mejor producción. La Tabla 1, muestra el porcentaje de maduración de ovocitos, para los dos medios de cultivos utilizados, tanto el convencional y el enriquecido con fluido uterino.

Tabla 1. Porcentaje de maduración de ovocitos *in vitro* de bovino para medios de cultivo convencional +fluido uterino.

Medio de cultivo	Nº ovocitos	Nº de ovocitos madurados	% de ovocitos madurados
Medio de cultivo convencional	218	150	68.81
Medio de cultivo convencional + FU de Camélido	210	142	67.62

No presentan diferencia estadística ($p < 0.05$).

Los resultados son superiores significativamente frente a los demás estudios en condiciones de altura de la zona del altiplano boliviano, con un periodo de incubación de 24 horas. Mamani (2017) obtuvo como dato el 61.79 %, adicionando la hormona luteinizante (LH) al fluido folicular a diferencia (Carazas, 2018) logró obtener el 44.73 % utilizando el medio de cultivo sintético TCM-199 suplementando la hormona Luteinizante (LH) y GnRH (eCG) esto puede atribuirse al suplementar diferentes componentes en la maduración *in vitro*. En el estudio actual se trabajó con medio de maduración comercial (BO-HEPES) sin ninguna suplementación alguna no afectando en la maduración a cambio se logró obtener una mayor expansión de ovocitos con un cúmulo compacto formado por varias capas de células.

La Tabla 2 muestra el porcentaje de desarrollo embrionario a las 48 horas, con el medio convencional, así como el medio de cultivo con adición del fluido uterino, comparando con lo que señala (Pahuara, 2015) con el medio SOFaa obtuvo el 39.19 % similar a nuestros resultados del 36.97 % con adición del fluido uterino, esto debido a que utilizó la misma técnica Swin up, produciendo la capacitación y reacción acrosomal, permitiendo la penetración de espermatozoides a través de la zona pelúcida.

Es necesario considerar el hecho de que el mayor problema del cultivo de embriones bovinos *in vitro* indicado en los trabajos de diversos autores, ha sido el bloqueo de las divisiones celulares que experimentan los embriones cuando alcanzan el estado de 8-16 células (Wright y Bondoli, 1981; Eyestone et al., 1987; Telford et al., 1990). La investigación muestra una mejora a razón al bloqueo logrando obtener desarrollo

de 8 células, Otros estudios han demostrado que los cigotos bovinos que se dividen tempranamente a las 32-36 horas post-fertilización *in vitro*, son más capaces a desarrollar al estadio de blastocisto, comparado a los que se dividen más tardíamente (Loneragan et al., 2000; Yadav et al., 1993).

Tabla 2. Porcentaje del desarrollo embrionario *in vitro* bovino cultivados a las 48 horas, con el medio de cultivo convencional + la adición del fluido uterino de camélido.

Medio de cultivo	Nº de cigotos cultivados	Nº de embriones en desarrollo	% de embriones en desarrollo
Medio de cultivo Convencional	121	38	31.40
Medio de cultivo convencional + FU de Camélido	119	44	36.97

No presentan diferencia estadística ($p < 0.05$).

Tabla 3. Porcentajes de clivaje para la producción de embriones *in vitro* bovino cultivados al día ocho, mediante la adición del fluido uterino de camélido al medio de cultivo.

Medio de cultivo	Nº de cigotos cultivados	Nº de mórulas	Nº de blastocistos	Nº de blastocistos Expandidos	Total de embriones
Medio de cultivo Convencional	121	13 (10.74%)	5 (4.13%)	0	18 (14.88 %)
Medio de cultivo convencional + FU de Camélido	119	15 (12.60%)	7 (5.88%)	2 (1.68 %)	24 (20.17 %)

Presentan diferencia estadística ($p > 0.05$).

Arista (2019) reporta que trabajó con semen congelado de toros homocigoto de la raza aberdeen angus, donde adicione el fluido oviductal sintético al medio de cultivo como resultado en etapa de blastocisto expandido obtuvo para el toro 0.82 % JTRM y 1.13 % VTRM, en cuanto a nuestros resultados no existe diferencias. Sin embargo con las células del epitelio oviductal (Muci et al., 2000) obtuvo 26.7 % superior al presente estudio, efectuó mediante una insición y raspado al oviducto, donde adicionó este componente al medio de cultivo logrando se evitar el bloqueo en el desarrollo, de tal forma que los embriones alcanzaron la etapa de blastocisto expandido viables y de calidad al día ocho de cultivo dentro del tiempo establecido.

El mayor aporte por parte del suero sanguíneo a los fluidos del oviducto y útero son las albuminas, α y β , y-globulinas y lipoproteínas de alta densidad. Sin embargo, el aporte de las inmunoglobulinas es mayor en el fluido uterino. Esto puede estar asociado al aumento de la motilidad uterina durante el estro y la consecuente entrada de microorganismos. En la

En los estadios más tempranos (embriones de 1-2 células) se utiliza el piruvato y/o el lactato y algunos aminoácidos, pero no la glucosa. De hecho, la adición de glucosa a los embriones bovinos fertilizados resulta en un descenso del desarrollo embrionario posterior (Takahashi y First, 1992). Esta puede ser la causa donde se observa un bajo porcentaje de clivaje de embriones al inicio, en su componente del fluido uterino se evidencia la glucosa, pero en bajas proporciones no afectando a tan extremo el desarrollo embrionario en las siguientes divisiones. El porcentaje del clivaje embrionario cultivados al día ocho suplementados con fluido uterino de camélido, se demostró por medio de prueba de chi cuadrado, donde existe diferencias significativas ($p > 0.05$) en ambos medios de cultivo lo cual demuestra claramente que no existe una relación entre ambos tratamientos, tal como lo muestra la Tabla 3, existiendo en sus resultados una mejoría con la adición del fluido uterino lograron su clivaje hasta blastocisto expandido del 1.68 % a diferencia sin la adición del 0 %.

especie bovina influyen el contenido de IgG donde actúa como defensa de microorganismos (Alavi-Shoushtari et al., 2014). Conforme a las investigaciones, puede ser un efecto benéfico para acceder al desarrollo de los embriones, evitándose la propagación de microorganismos en el medio de cultivo a la vez permitiendo su desarrollo hasta la etapa de blastocisto expandido.

Respecto en la etapa de mórula y blastocisto temprano (Mamani, 2017) llego a obtener 2.27 % en mórula y en blastocisto el 0 % a diferencia de nuestro resultado donde se adicionó al fluido uterino alcanzando un mayor porcentaje de mórulas 12.60 % y blastocistos 5.88 %, a diferencia del anterior estudio donde no se adicionó ningún suplemento en condiciones de altura, tal como lo muestra la Figura 1. Debe plantearse en suplementar al medio de cultivo con algún componente para promover propiedades embrióticas, ayudando a la compactación y blastulación del desarrollo embrionario del ganado bovino.

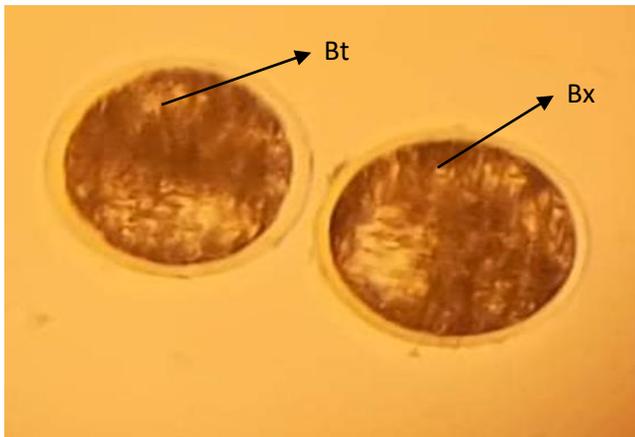


Figura 1. Blastocisto temprano (Bt), blastocisto expandido (Bx)

A su vez Soto et al. (2019b) registró una incidencia del 30 % mórulas y 7 % blastocistos cultivados al día ocho con células del oviducto, no habiendo diferencia en el resultado actual. A si mismo, De los Reyes et al. (2003) evaluó los porcentaje de desarrollo embrionario al comienzo del cultivo, a las 24 horas y al sexto día de incubación con la adición de células epiteliales ovidutales (BOEC), sin embargo la proporción total de blastocistos tempranos al sexto día fue significativamente superior al obtenido del 12.3 %, no habiendo ninguna complicación en el tiempo de incubación, por ende podría incubarse hasta esta etapa pero dependería de la suplementación en la que se utilice.

El fluido uterino tiene en su composición altos niveles de albumina lo que mejora en el desarrollo embrionario del bovino protegiendo de sustancias tóxicas, aportando los factores de crecimiento a ciertas hormonas, previniendo a que los embriones se adhieran al instrumental todo lo contrario al medio de cultivo.

No obstante, existe otro componente que recorre todo el largo del oviducto y útero denominándose la glucosa, principal fuente de energía para la división del desarrollo celular (Thompson y Peterson, 2000). En el presente estudio las referencias recabadas (Gardner y

Lane, 2002) sobre la concentración de glucosa se encuentra 3.15 mM en el útero, este requerimiento en base al fluido uterino suplementado permite al desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto expandido.

Los factores biológicos y técnicos que posiblemente hayan contribuido en las bajas tasas del desarrollo embrionario en ambos medios de cultivos, pueden estar presentes en el tiempo entre colección de ovarios e incubación. Por esto, se precisa la reducción de este factor, así como el estricto control térmico tanto en el manejo de los ovarios como de los gametos obtenidos durante todo el proceso, Así mismo, existe otra causa en lo referente a la maduración incompleta o la vejez de los ovocitos cultivados.

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

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

Tabla 4. Clasificación de los embriones de bovinos producidos *in vitro* según IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones).

Medio de cultivo	Nº de cigotos cultivados	Nº de embriones de excelente calidad o buena	Nº de embriones de regular calidad	Nº de embriones de mala calidad	Nº de embriones muertos y degenerados
Medio de cultivo convencional	121	12 (9.91 %)	24 (19.83 %)	30 (24.79 %)	55 (45.55 %)
Medio de cultivo convencional + FU de camélido	119	18 (15.13 %)	30 (25.21 %)	33 (27.73 %)	38 (31.93 %)

En la Tabla 4 se muestra el resultado de la clasificación embrionaria según su calidad luego del día ocho, para el medio de cultivo convencional se obtuvo los siguientes resultados (excelente calidad de 9.91 %, regular calidad 19.83 %, mala calidad 24.79 %, muertos y degenerados 45.45 %) (no coinciden los valores) y para el medio de cultivo suplementado con el fluido uterino de camélido (excelente calidad 15.13 %, regular calidad 25.21 %, mala calidad 27.73 %, muertos y degenerados 31.93 %) se establecieron de acuerdo a las normas de la Sociedad Internacional de Transferencias de Embriones no encontrando diferencias entre ambos tratamientos.

A diferencia de Pahuara (2015) obtuvo porcentajes bajos haciendo referencia al SOFaa (Fluido oviductal sintético) del (3.03 % de embriones de excelente calidad, 8.69 de regular calidad y de 6.62 % de mala calidad, muertos y degenerados del 81.66 %. En la clasificación de embriones producidos *in vitro*, se presentó embriones degenerados del 31.93 % para el cultivo + FU en relación al medio de cultivo 45.55 %. Estudios realizados por Holm y Henrik (1998) reportaron una incidencia del 15 a 30 %, donde observaron anomalías cromosómicas, otro caso es por mixoploides, o sea poseían dos o más líneas celulares, se daba cuando alcanzaban el 72 % de 151 embriones degenerados. No hay duda que los medios de cultivo embrionario afectan la calidad embrionaria, por lo que, hasta la actualidad, no hay suficiente información para concluir cuál es el "mejor" de los medios o sistemas de cultivo (Millano et al, 2016).

CONCLUSIONES

Los porcentajes para la maduración de ovocitos *in vitro*, para ambos grupos son similares, promoviendo la expansión del cumulus ophorus y el reinicio de la meiosis. El porcentaje de embriones cultivados a las 48 horas post inseminación se obtuvo el 31.40 % para el medio de cultivo convencional y 36.97 % para el medio de cultivo más fluido uterino de Llama. No existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre ambos tratamientos, atribuyen un mayor

progreso sobre el desarrollo embrionario bovino *in vitro*. El porcentaje de embriones cultivados al día ocho, con la adición de fluido uterino de Llama, mejora el desarrollo hasta el estadio de blastocistos expandido del 1.68 %, por su parte al medio de cultivo sin fluido uterino del 0 %. Existiendo diferencia estadística ($P > 0.05$). Los embriones de ganado bovino fueron clasificados según su calidad de acuerdo a las normas IETS, tras realizada la evaluación sobre el desarrollo embrionario existe una mayor competencia en el medio cultivo más fluido uterino.

BIBLIOGRAFÍA

- Alavi-Shoushtari, SM; Abedizadeh, R; Khaki, A; Mokarizadeh, A; Dorostkar, K. 2014. A study on the effects of the estrous cycle on uterine fluid and blood serum immunoglobulin G (IgG) content in the cow (en línea). Veterinary Research Forum 5(2):115-119. Consultado 10 ene. 2021. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279631/>
- Arista, MA. 2019. Determinación y comparación de la capacidad fecundante en la producción de embriones *in vitro* de dos bovinos homocigotos de la raza aberdeen angus en la región amazonas. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza De Amazonas (en línea). Tesis Lic. Chachapoyas, Perú. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Consultado 15 ene. 2021. Disponible en <http://repositorio.untrm.edu.pe/handle/UNTRM/1975>
- Carzas, K. 2018. Evaluación de dos medios para la maduración de ovocitos *in vitro* en ganado bovino (*Bos Taurus*) en condiciones de altura (en línea). Tesis Lic. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. Consultado 11 feb. 2021. Disponible en <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/20534>

- Bang, JI; Jin, JI; Ghanem, N; Choi, BH; Fakruzzaman, M; Ha, AN. 2015. Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. *Theriogenology*: 84(4):509-523
- Block, J; Hansen, PJ; Loureiro, B; Bonilla, L. 2011. Improving post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro: Actions of insulin-like growth factor- 1, colony simulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology* 76(9):1602-1609.
- Da Costa, N; Bryto, K; Santana, P; Corderio, M; Silva, T; Santos, A. 2016. Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Theriogenology* 85(2):323-329.
- De los Reyes, SM; Stuardo, J; Barros, C. 2003. Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario bovino in vitro. Universidad de Chile. Laboratorio de Reproducción Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago-Chile
- Enright, B; Lonergan, P; Dinnyes, A; Fair, T; Yang, X; Boland, M. 2000. Culture of in vitro produced bovine zygotes vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* 54:659-673.
- Eyestone, W; Leibfried, M; Northey, D; Gilligan, B; First, N. 1987. Culture of one-cell embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 28:1-7.
- Fukui, Y. 1990. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro (en línea). *Mol. Rep. Dev.* 26:40-46. Consultado 16 feb. 2021. Disponible en DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260107>
- Galli, C; Duchi, R; Crotti, G; Turini, N; Ponderato, N; Colleoni, S; Lazzari, G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59:599-616.
- Gardner, D; Lane, M. 2002. Evolution of sequential media. Cibelli, J; Lanza, R; Campbell, K; West, W. (Eds), *Principles of Cloning*, 187-213 p.
- Hansen, P. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle-an overview. *Theriogenology* 65:119-125.
- Holm, P; Henrik, C. 1998. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. Embryo Technology Center, Danish Institute of Agricultural Sciences.
- Lonergan, P; Gutierrez-Adn, A; Pintado, B; Fair, T; Ward, F; De La Fuente, J; Boland, M. 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-1 growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 57:146-152.
- Lonergan, P; Pedersen, H; Rizos, D; Greve, T; Thomsen, P; Fair, T; Boland, M, 2004. Effect of the postfertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 71:1096-1100.
- Lopera-Vasquez, R; Hamdi, M; Maillou, V; Gutierrez, A; Bermejo, P; Ramirez, M. 2017. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryodevelopmental and quality in vitro. *Reproduction* 153(4): 461-470.
- Mamani, A. 2017. Evaluación de la Fertilización in vitro en ganado Bovino en condiciones de Altura. Tesis Lic. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 95 p.
- Millano, Z; Rosell, L; Urribarí, Y; Sánchez, R; Báez, F; Villamediana, P. 2016. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la producción in vitro de embriones *Bos taurus* x *indicus*. *Revista Científica* 26(3):173-180.
- Morales, J. 2017. Las biotecnologías reproductivas en bovinos como herramientas en la producción de leche (en línea). Consultado 16 mar. 2021. Disponible en <https://www.ganaderia.com/destacado/Las-biotecnolog%C3%ADas-reproductivas-en-bovinos-como-herramientas-en-la-producci%C3%B3n-de-leche>
- Muci, ACG; Correa, SJ; Cubillos, GV; Tadich, BN. 2000. Cultivo in vitro de embriones bovinos. Universidad Austral De Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Reproducción Animal. Valdivia-Chile.
- Pahuara, LE. 2015. Evaluación de dos protocolos para la producción in vitro de embriones "bovinos" *Bos taurus* en la región de Ayacucho 2012-2013. Tesis Lic. Ayacucho, Perú. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 96 p.
- Peixoto, E. 2010. The Challenges of Making a Blastocyst-Stage Embryo: Impact of Heat Stress & Technical Factors Associated with IVP Procedures. University of Tennessee, USA.
- Perry, G. 2014. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals (en línea). Consultado 16 mar. 2021. Disponible en <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/December2015.pdf>
- Rizos, D; Fair, T; Papadopoulos, S; Boland, M; Lonergan, P. 2002. Developmental, qualitativ,

- and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 62:320-327.
- Soto, Y; Casas, E; Betancourt-Rule, JM; Fernández-Reyes, F. 2019. Desarrollo embrionario de bovino in vitro cocultivado con células oviductales y del cumulus oophorus (en línea). *Revista de Salud Animal* 41(1):1-8. Consultado 16 ene. 2021. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v41n1/2224-4700-rsa-41-01-e01.pdf>
- Takahashi, Y; First, N. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37(5):963-978.
- Telford, N; Watson, A; Schultz, G. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol. Reprod* 26:90-100
- Tervit, H; Whittingham, D; Rowson, L. 1972. Successful culture in vitro sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 30:493-497.
- Thompson, G; Peterson, AJ. 2000. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Human Reproduction*. 15(5):59-67.
- Wright, R; Bondoli, K. 1981. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Sel* 53:70
- Yadav, BR; King, WA; Betteridge, KJ. 1993. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex and developmental rates of bovine embryos generated in vitro (en línea). *Molecular Reproduction and Development* 35(4):434-439. Consultado 15 mar. 2021. Disponible en DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360405>

Artículo recibido en: 13 de octubre 2021

Aceptado en: 09 de diciembre 2021