



# Title: In vitro fertilization in small ruminants: a review

Authors: Sagastume, Dulce, Tabarez, Abigail, Garcez, Nora and Alarcón, Marco

- LJK-1448-2024 ID 0009-0007-3701-1116 2069389
- KFA-2915-2024 ID 0000-0002-8766-6993 176667
- EUS-5606-2022 ID 0000-0002-4712-4663 240743
- LJR-9779-2024 ID 0000-0002-4712-6327 176712

Editorial label ECORFAN: 607-8695  
 BCIERMMI Control Number: 2024-01  
 BCIERMMI Classification (2024): 241024-0001  
 RNA: 03-2010-032610115700-14  
 Pages: 15

CONAHCYT classification:  
 Area: Biotechnology and Agricultural Sciences  
 Field: Agricultural Sciences  
 Discipline: Animal production  
 Subdiscipline: Reproduction

ECORFAN-México, S.C.  
 Park Pedregal Business. 3580,  
 Anillo Perif., San Jerónimo  
 Aculco, Álvaro Obregón,  
 01900 Ciudad de México, CDMX,  
 Phone: +52 1 55 6159 2296  
 Skype: ecorfan-mexico.s.c.  
 E-mail: contacto@ecorfan.org  
 Facebook: ECORFAN-México S. C.  
 Twitter: @EcorfanC

www.ecorfan.org

Holdings		
Mexico	Colombia	Guatemala
Bolivia	Cameroon	Democratic
Spain	El Salvador	Republic
Ecuador	Taiwan	of Congo
Peru	Paraguay	Nicaragua



# Introduction



La fecundación *in vitro* (FIV) representa una de las tecnologías reproductivas más importantes en Norteamérica y América Latina. Durante la última década su uso ha progresado significativamente en todo el mundo (Bello, 2022).



## Técnica convencional (FIV):

Consiste en fecundar un ovocito madurado artificialmente con un espermatozoide criopreservado, bajo condiciones controladas.

La FIV se basa en la maduración artificial de gametos no fecundados (oocitos), estos, pueden provenir de ovejas o cabras sacrificadas, de los cuales los oocitos serían recolectados a través de una técnica de corte o llamada Slicing, por otro lado, la recolección también podría ser a través de la aspiración folicular (Hernández-Marín *et al.*, 2018).





Universidad Veracruzana

## Ventajas de la fecundación *in vitro*

Aumenta el índice en los programas de producción.

Descendencia elevada de la calidad genética.

Embriones de calidad a un costo bajo.

Beneficia a las hembras que presentan problemas de infertilidad, alteraciones estructurales o de funcionamiento a nivel del tracto genital.



Herradón *et al.* (2007)



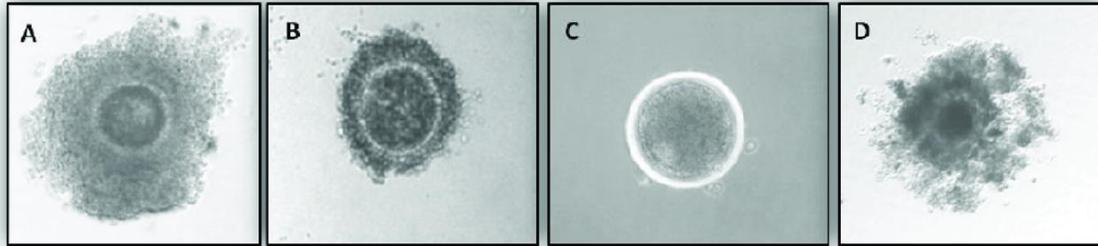


# Methodology



## Selección de ovocitos:

Una vez recolectados los ovocitos, se procede a su selección. Esta etapa es muy importante debido a que la selección de estos debe ser de alta calidad para obtener los mejores resultados en la Maduración in vitro (MIV) y posteriormente en la FIV. La clasificación de los ovocitos se basa en el análisis crítico según sus aspectos morfológicos.



### Criterios:

1. El diámetro del ovocito
2. El aspecto citoplasmático
3. Las características morfológicas del cumulus que rodea al ovocito

## Clasificación:

Calidad 1 o calidad A: su citoplasma es homogéneo con granulaciones finas.

Calidad 2 o calidad B: su citoplasma es homogéneo, pero se aprecian áreas pequeñas de pigmentación irregular, mientras que su cumulus es compacto, pero de menor tamaño.

Calidad 3 o calidad C: Son considerados irregulares ya que presentan un citoplasma completo, pero vacuolizado.

Calidad 4 o calidad D: Tienen un citoplasma completamente heterogéneo pigmentado, son considerados ovocitos malos y de nula calidad (Mamani, 2017).



## Maduración *in vitro* (MIV):

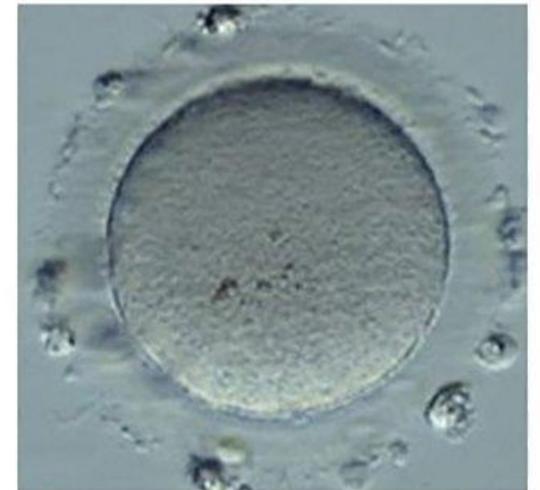
Es de las etapas más importantes para lograr con éxito la FIV. Se trata del proceso siguiente a la recolección y selección de los ovocitos y los COC'S. Es considerada la etapa en la cual los gametos femeninos alcanzan la capacidad para ser fecundados, por ende, estos gametos finalizan su desarrollo durante la MIV llegando al estadio de Metafase II, donde maduran completamente al completar la competencia nuclear y citoplasmática (Fernández *et al.*, 2007b).

### Proceso de la MIV

1. Transporte
2. Lavado de ovarios
3. Recolección de ovocitos por corte Slicing. Se realizan cortes con ayuda de una hoja de bisturí estéril, cortando los folículos que tienen un diámetro de 2 a 6 mm.
4. Lavado del folículo. Se lava con medio de maduración (TCM-199 suplementado con heparina, gentamicina y HEPES) (Cuéllar, 2020).



Corpúsculo polar





Se seleccionan aquellos ovocitos con tres o más capas de células del cumulus y aquellos cuyo citoplasma es homogéneo (Cuéllar, 2020).

La MIV de los ovocitos de ovino y caprino se realiza en grupos de 25 ó 50 ovocitos e incubados a 38-39 °C en atmósfera humidificada del 5% de CO<sub>2</sub> en el aire durante 24 a 27 horas (Paramio & Izquierdo, 2014).



El medio de maduración comúnmente utilizado es el TCM 199, puede ser suplementado con:

- Suero fetal bovino (SFB)
- Piruvato
- Glucosa y penicilina
- Estreptomicina



## Fecundación *in vitro* (FIV)

La FIV se define como el proceso en el que el ovocito previamente madurado es penetrado por un espermatozoide capacitado fuera del tracto genital de la hembra, imitando la interacción del gameto femenino con el masculino, formando los pronúcleos y realizando la singamia bajo condiciones controladas (Cuéllar, 2020).

El proceso de fecundación *in vitro* puede llevarse a cabo de la siguiente manera:

- Una vez concluida la maduración *in vitro* se procede al denudamiento de los ovocitos, esto se realiza con ayuda de una pipeta y a un flujo constante a una presión de 180  $\mu$ l.
- Ya que los ovocitos son denudados, deben recibir dos lavados para poder ser situados en un medio de cultivo. El medio más conocido es el Fluido Oviductual Sintético (SOF), éste debe ser esterilizado y equilibrado en una incubadora de atmósfera, a una temperatura que osciló los 38.5 °C.
- Al finalizar el lavado, los ovocitos denudados se deben colocar en SOF para ser fecundados a una concentración final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides (Cánovas & Coy, 2008; Paramio & Izquierdo, 2014; Ugalde *et al.*, 2021).

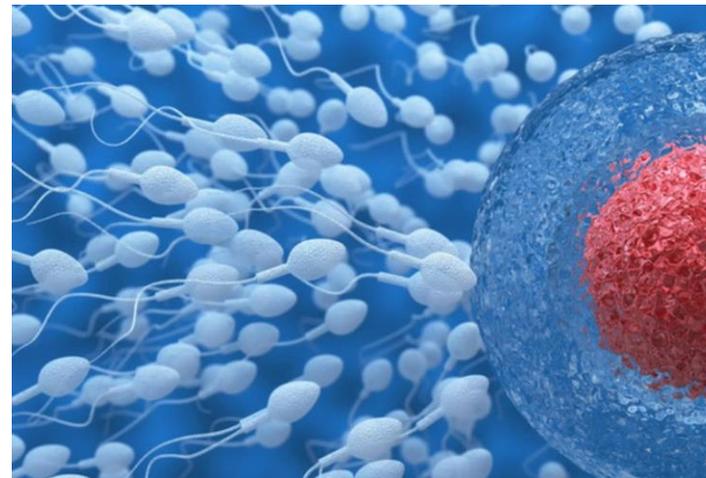


## Capacitación espermática

La capacitación espermática es un proceso en donde el espermatozoide sufre cambios tales como:

- La fosforilación de proteínas
- La eliminación de colesterol de la membrana plasmática
- La elevación de calcio intracelular.

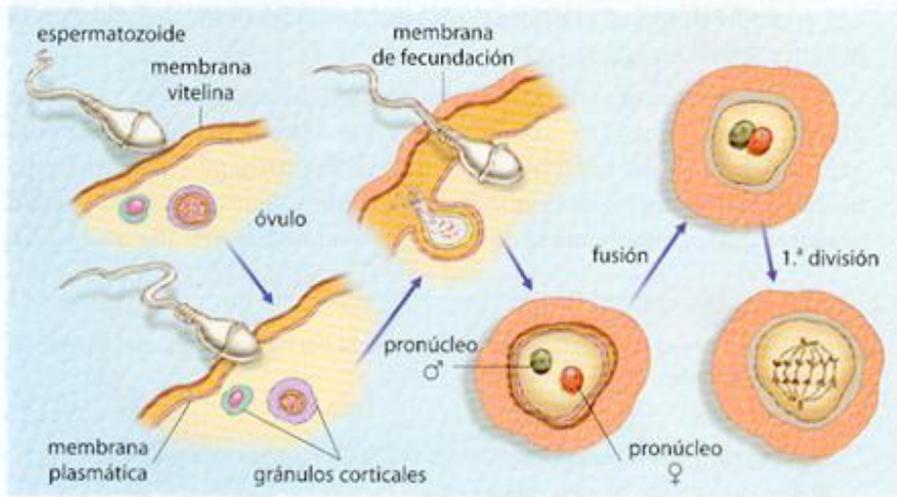
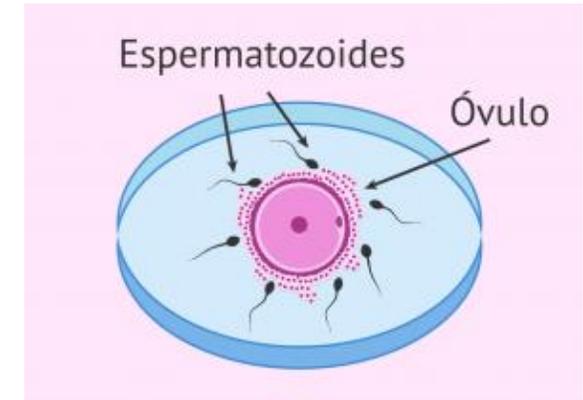
Esta capacitación se puede lograr al exponer al espermatozoide en concentraciones de cafeína y/o heparina, sustancias que ayudarán a estimular el proceso de capacitación en los espermatozoides, preparándolos para la interacción y fecundación del óvulo (Jácome *et al.*, 2014).





## Fusión de gametos:

Con la fusión de gametos se concluye el proceso de la fecundación *in vitro*. La zona pelúcida sufre un cambio en donde se expande y una vez iniciada la reacción del acrosoma se fija la cabeza del espermatozoide con ayuda de receptores que actúan como proteínas ligantes sobre la ZP, posteriormente se liberan enzimas que ayudan en la motilidad del espermatozoide para lograr penetrar hasta el interior del ovocito (Hafez & Hafez, 2000).

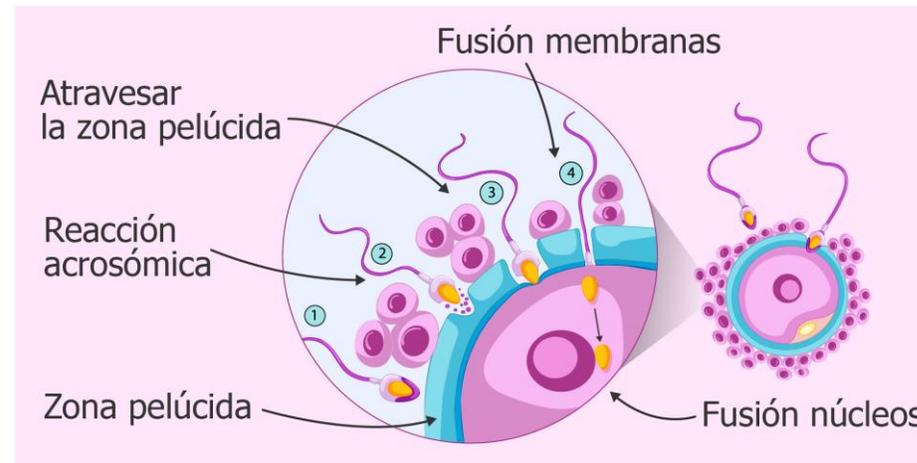


La fusión de los gametos se realiza con un medio de Tyrode's tamponado. Se utilizan de 10 a 15 ovocitos desnudos, añadiéndoles una dosis de 1 millón de espermatozoides aproximadamente por ml de medio. Posteriormente los ovocitos se dejan en una incubadora bajo altas concentraciones espermáticas para poder reforzar la posibilidad de ser fecundados. Los ovocitos llegan a ser penetrados por los espermatozoides a las tres horas de haber iniciado la fusión (Cánovas & Coy, 2008).



## Activación del ovocito

El ovocito, metabólicamente inactivo, experimenta tras la fusión con el espermatozoide un “despertar” que, mediante una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, le va a conducir a la diferenciación y formación de un nuevo individuo. Este despertar del ovocito se conoce como activación (Cuéllar, 2020).



Cuando el espermatozoide penetra al ovocito ocurre una liberación de calcio intracelular persistiendo entre 3 o 4 horas, ocasionando una reacción en los gránulos corticales en el ovocito, la cual libera enzimas que alteran la conformación de la ZP. Esta alteración ocasiona una disminución en la afinidad de los espermatozoides con el ovocito, por ende, se bloquea la entrada de espermatozoides adicionales, lo que resulta importante para evitar la poliespermia (Olivera *et al.*, 2006).



En este proceso, también se da una serie de vías de señalización que logran terminar la segunda división meiótica en el ovocito y con esto la expulsión del segundo cuerpo polar (Cerdo, 2019).

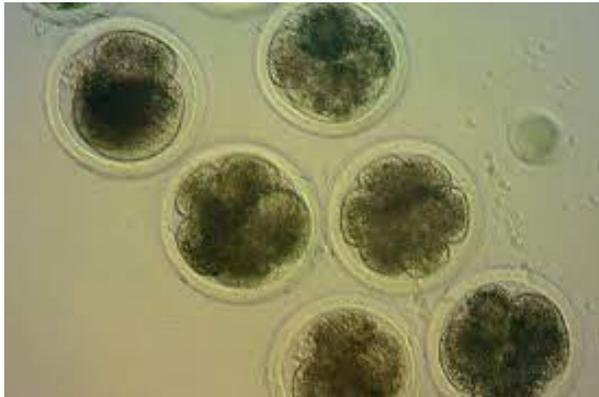
La activación química del ovocito se realiza mediante el cultivo en un medio, por ejemplo, el SOF-HEPES conteniendo Ca por un tiempo aproximado de 4 minutos a una temperatura de 39 °C y rápidamente después se cultivan con otro medio en gotas de 100  $\mu$ l por ejemplo el medio SOF-IVC que se suplementa con albúmina de suero bovino (BSA) y otros compuestos más por cinco horas en una atmósfera húmeda con el 5% de CO<sub>2</sub> al aire a una temperatura de 38.5 °C (Benavides, 2012).





## Cultivo *in vitro* de embriones

El proceso inicia cuando los embriones presentan más de cuatro células resultantes de la fecundación *in vitro*, en este momento son retirados del medio de maduración para continuar con su proceso de división celular en un medio especial de cultivo de embriones, es ahí donde terminarán la división de ocho, dieciséis y treinta y dos células para llegar a mórulas y blastocitos. Al momento de llegar a estas etapas, los embriones son transferidos a ovejas receptoras de dos maneras: en fresco o congelados (Ugalde *et al.*, 2021).



Esta etapa determina la eficiencia total del protocolo, del mismo modo demuestra la calidad del proceso mediante el resultado de los embriones que se lleguen a obtener.



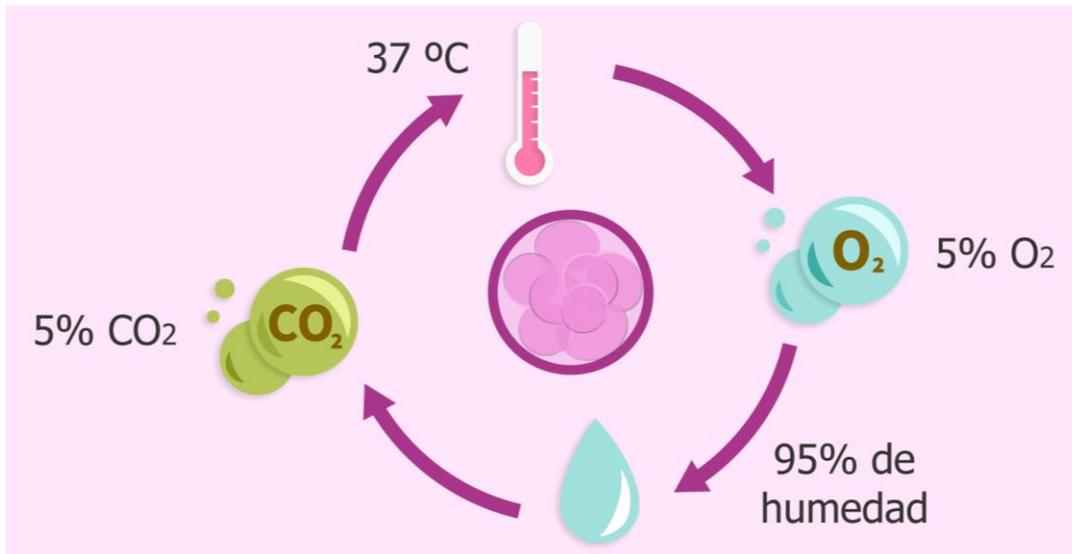
## Condiciones de cultivo

### Tensión de oxígeno

Las condiciones convencionales de incubación de los embriones durante el cultivo son las mismas que las empleadas para la MIV y la FIV, es decir, 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera saturada de humedad a una temperatura de 38.5-39°C.

Se ha demostrado que el cultivo de embriones en volúmenes reducidos de medio o en grupos incrementa significativamente el desarrollo a blastocisto.

Relación: embriones/volumen de medio



En cuanto a los elementos orgánicos que se deben tener en cuenta son:

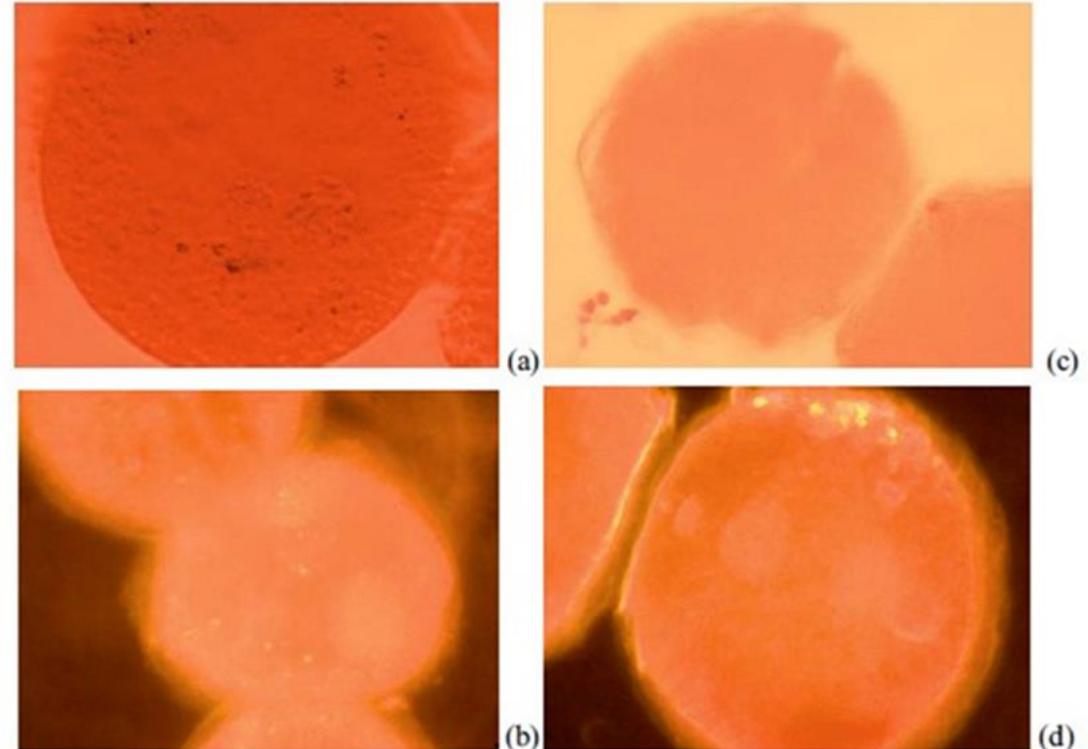
- Fuente de energía, las más comúnmente utilizadas en los medios de cultivo son el lactato, el piruvato y la glucosa (Mucci *et al.*, 2006).
- También se debe tener en cuenta la fuente de proteína, como los aminoácidos, los cuales son elementos de relativa importancia ya que participan en la regulación del desarrollo de los embriones (Ramírez, 2020).



## Evaluación de la fecundación *in vitro*

La fecundación *in vitro* se puede evaluar mediante la observación de la tasa de segmentación a las 18 y 48 horas posteriores a la fecundación; el estadio de mórula y de blastocisto entre los 6 y 8 días. Los ovocitos suelen ser lavados con citrato de sodio al 3%, se desnudan y se fijan con etanol-ácido acético durante 24 horas a 4°C. Después de esto, se tiñe con acetato-orceína al 1.1 %, y se clasifican de la siguiente manera:

- A. Penetrados (dos pronúcleos en el citoplasma del cigoto, puede aparecer una cola de espermatozoide o la cabeza descondensada).
- B. Asincrónicos (son ovocitos que suelen ser penetrados por un solo espermatozoide).
- C. Grupo C (se detienen en la etapa de Telofase II, aunque suelen ser ovocitos activos).
- D. Grupo D (se caracterizan por aquellos cigotos poliespermáticos, suelen presentar más de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares) (Báez *et al.*, 2010).





# Conclusion

Esta investigación contribuye al fortalecimiento de conocimientos teóricos sobre la técnica de fecundación *in vitro* aplicada en pequeños rumiantes. La fecundación *in vitro* toma un importante auge en estas especies, brindando valiosas oportunidades en los temas de reproducción y mejoramiento genético, así mismo demuestra tener un impacto positivo en el avance científico, ayudando a ampliar los conocimientos sobre las etapas que comprende el complejo fenómeno de la reproducción.



# References



## Antecedentes

- Bello, D. M. [2022]. Aspiración de ovocitos y fecundación *in vitro*, la tecnología reproductiva emergente. *Revista global del rumiante*, 4(1), 24-51.
- Cuéllar, D. C. [2020]. Producción de blastocistos partenogénéticos a partir de ovocitos aspirados de ovarios de ovinos con o sin cuerpo lúteo. *Digital Zamorano*, 2(1) 1-3. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/6841>
- Hernández-Marín, A., Gutiérrez-Chávez, A., Valencia-Posadas, M. & Cortez-Romero, C. [2018]. Aspiración de ovocitos por laparoscopia para la transferencia de embriones en cabras: una revisión. *Abanico veterinario*, 8(2), 14-23. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.82.1>
- Herradón, P. G., Quintela, L. A., Becerra, J. J., Ruibal, S. & Fernández, M. [2007]. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch Latinoam Prod Anim*, 15(1), 33-40.

## Básicos

- Báez, C. F. J., Chávez, C. A. C., Hernández, F. H. J. & Villamediana, M. P. C. [2010]. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista Científica*, 20(3), 259-267. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592010000300007](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300007)
- Cánovas, S. & Coy, P. [2008]. Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. *Revista de Investigación Clínica*, 60(5), 403-413. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=41234>
- Fernández, R. F., Hernández, P. J. E. & Pichardo, C. A. I. [2007b]. Maduración *in vitro* de ovocitos de ovino usando concentraciones de FSH+ LH y FSH en medio de cultivo. *Revista de Salud Animal*, 29(2), 105-110. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2007000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2007000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Paramio, M.T. & Izquierdo, D. [2014]. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reproduction in domestic animals*. 49 (Suppl. 4), 37-48. [doi: 10.1111/rda.12334](https://doi.org/10.1111/rda.12334)
- Ugalde, J. R., Cervera-Paúl, D., Domínguez-Rebolledo, Á., Baeza-Rodríguez, J., Pinzón-López, L. & Zamora-Bustillos, R. [2021]. Fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos obtenidos en ovejas mediante la técnica de recolección laparoscópica de óvulos. *Investigación y Ciencia*, 29(81), 15-23. <https://www.redalyc.org/journal/674/67466172002/html/>



**ECORFAN®**

© ECORFAN-Mexico, S.C.

No part of this document covered by the Federal Copyright Law may be reproduced, transmitted or used in any form or medium, whether graphic, electronic or mechanical, including but not limited to the following: Citations in articles and comments Bibliographical, compilation of radio or electronic journalistic data. For the effects of articles 13, 162, 163 fraction I, 164 fraction I, 168, 169, 209 fraction III and other relative of the Federal Law of Copyright. Violations: Be forced to prosecute under Mexican copyright law. The use of general descriptive names, registered names, trademarks, in this publication do not imply, uniformly in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protector in laws and regulations of Mexico and therefore free for General use of the international scientific community. BCIERMMI is part of the media of ECORFAN-Mexico, S.C., E: 94-443.F: 008- ([www.ecorfan.org/](http://www.ecorfan.org/) booklets)