

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POST GRADO  
MAESTRÍA EN GANADERÍA ANDINA  
ESPECIALIDAD EN REPRODUCCIÓN ANIMAL



COLECCIÓN, CULTIVO Y MADURACIÓN *IN VITRO*, DE  
OVOCITOS DE VACAS (*Bos Taurus*) EN EL  
ALTIPLANO BOLIVIANO

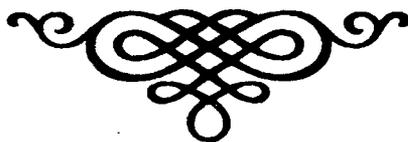
## TESIS:

PRESENTADA POR:

**FRANCISCO FLORES LOPES**

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAGISTER SCIENTIAE  
EN REPRODUCCIÓN ANIMAL



PUNO - PERÚ

2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
BIBLIOTECA CENTRAL AREA DE TESIS
Fecha Ingreso: 13 OCT 2014
Nº 00690

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
ESCUELA DE POST GRADO  
MAESTRÍA EN GANDERÍA ANDINA  
ESPECIALIDAD EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**TESIS**

**COLECCIÓN, CULTIVO Y MADURACION *IN VITRO*, DE OVOCITOS  
DE VACAS (*Bos taurus*) EN EL ALTIPLANO BOLIVIANO**

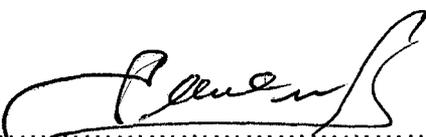


Presentada a la Dirección de Investigación de la Maestría en Ganadería Andina, como requisito para optar el Grado Académico de:

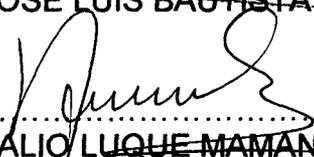
**MAGISTER SCIENTIAE  
EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

REVISADO Y APROBADO POR EL SIGUIENTE JURADO:

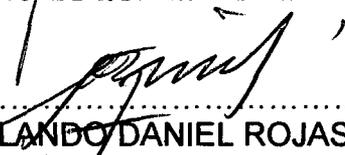
PRESIDENTE

  
.....  
Ph. D. JOSÉ LUIS BAUTISTA PAMPA

PRIMER MIEMBRO

  
.....  
Dr. NATALIO LUQUE MAMANI

SEGUNDO MIEMBRO

  
.....  
M. Sc. ROLANDO DANIEL ROJAS ESPINOZA

DIRECTOR DE TESIS

  
.....  
Mg. JESÚS MARTÍN URVIOLA SANCHEZ

PUNO – PERÚ  
2012

## DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Pedro.....y  
a mi querida madre Tiburcia, que siempre me apoyó  
en todos mis retos sociales, académicos y otros.

Con cariño y gratitud a mis hermanos Martín, Damián,  
Inocencio, Macario, Alberto, cuñadas y sobrinos, para  
quienes soy una semilla que enraíza conocimientos para  
la familia y a la sociedad, gracias por todo.

A mi querida esposa A. Nieves Paucara, a mis hijos:  
Hugo, Yessika, Anibal (pingüino) y Jazmín (chunchita);  
razón de vivir, fuente de inspiración, donde los retos no  
son imposibles y la felicidad es interminable.

A los setas y zorros inmortales.....!!!!

Con cariño: **Francisco Flores Lopez**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Escuela de Post Grado de la Universidad Nacional del Altiplano, especialmente a la Maestría en Ganadería Andina, por formar profesionales que aportan el desarrollo de la ganadería.

A todo el plantel docente de la Maestría en Ganadería Andina: Especialidad en Reproducción Animal, por impartir sus conocimientos y experiencias.

Al director de la Maestría en ganadería M. Sc. Mario Rubén Zabaleta Jibaja, por su gran labor en la dirección de la maestría.

A los ex directores de la Maestría en ganadería M. Sc. Ceferino Uberto Olarte Daza, y Mg. Martín Jesús Urviola Sanchez, por la gran labor realizada.

Al Mg. Martín Jesús Urviola Sanchez, en su calidad de asesor de la presente investigación por haberme orientado en la ejecución y culminación del presente trabajo.

Al Benson Agriculture And Food Institute de la Universidad de Brygham Young, de Utah (Estados Unidos) por su colaboración para la ejecución de la maestría.

Al Ing. Zoot. Richard Machicado Gómez, por su incansable e incondicional contribución para el desarrollo y conclusión de esta investigación.

Al Ing. Zoot. Luis Limachi Ajpi, por su incansable e incondicional contribución para el desarrollo de esta investigación.

Al Ing. Zoot. M.Sc. Pedro A. Delgado C., por su incondicional contribución para el desarrollo y contribución de esta investigación.

A mis compañeros de la maestría: M.V.Zs Sandro Ramírez, Waldo Choque Alberto Tintaya, Hermenegildo Mamani, Nubia Catacora, David Paredes, Jesús

Titi Pacosonco, Ings. Cesar Ordoñez, Beltrán Mamani, otros, gracias por hacerme sentir en casa.

A los Ingenieros Zootecnistas: Victor Gonzales, Mario Acho (†), Cristobal Achu, Marcia Choque, Felipe Chura, Marcelo Condori, Eloy Tuco, Rosmidi Pachani, Jhon Gonzales, Rubén Vera, Humber Alberto, Fortunato Limachi, Franklin Blanco, Cesar Quispe, Alberto M. Cruz, Pedro Cárdenas, Luisa Aguilar, Judith Mardones, Walter López, Melecio Gonzales, Giovani Mita, Richard Cenker y todos los que forman y formarán la gran familia zootécnica, gracias por su apoyo, lealtad fraterna e infinita.

A la Sra. Secretaria de la Maestría en Ganadería Andina: Judy Castañeda, Benavides, gracias por su cooperación, exigencia, alegría, optimismo y jovialidad.

Al señor Mariano Félix Chahuares y su familia, gracias por colaborarme y por hospedarme en su hogar durante todo mi tiempo de estadía en Puno Perú.

A todos que indirecta o directamente, apoyaron incondicionalmente en la ejecución y culminación de esta investigación.

A los distinguidos miembros del tribunal de la presente investigación, por sus consejos y aportar en la conclusión de esta investigación.

## ÍNDICE

Índice general:	Pág.
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	ix
CAPITULO I.....	1
PROBLEMÁTICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
CAPITULO II.....	6
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. LA GANADERÍA BOVINA.....	6
2.1.1. El ganado bovino en Latinoamérica.....	6
2.1.2. Principales países productores de ganado vacuno.....	7
2.2. REPRODUCCION BOVINA.....	8
2.2.1. La función reproductiva del ganado lechero.....	9
2.2.2. Generales del tracto reproductivo de la vaca.....	9
2.2.2.1. Vagina.....	9
2.2.2.2. Cervix.....	10
2.2.2.3. Útero.....	10
2.2.2.4. Oviductos.....	10
2.2.2.5. Ovarios y el óvulo.....	11
2.3. FISILOGIA DEL COMPLEJO CUMULUS OOFURUS.....	11
2.3.1. Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito.....	11
2.3.2. Bloqueo meiótico y reinicio de la meiosis.....	13
2.3.3. Inhibición del reinicio de la meiosis.....	14
2.3.4. Características de un ovocito maduro.....	15
2.3.5. Importancia del cúmulus oofurus.....	15
2.4. TÉCNICAS ARTIFICIALES DE RECUPERACION DE COCs.....	16
2.4.1. Obtención de ovocitos.....	16
2.4.2. Morfología del oocito inmaduro para cultivo <i>in vitro</i> .....	17
2.4.3. Desarrollo morfológico del oocito durante la maduración.....	17
2.4.4. Morfología del oocito maduro.....	18
2.4.5. Características de oocitos seleccionados.....	19
2.4.6. Criterios de clasificación y denominación de los COCs.....	20
2.4.7. Expansión del cúmulo celular.....	21
2.5. CONSIDERACIONES PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	22
2.5.1. Método de cultivo de ovocitos.....	23
2.5.2. Protocolos de recuperación y maduración de ovocitos.....	23
2.5.2.1. Colecta de ovarios.....	23
2.5.2.2. Tiempo y medios de Maduración <i>in vitro</i> .....	27
2.6. EXPERIENCIAS DE TRABAJOS DE MADURACIÓN.....	28
2.6.1. Recuperación ovocitaria de bovinos.....	28
2.6.2. Maduración de ovocitos de bovinos.....	28
2.6.3. Fijación y Tinción de ovocitos.....	29
2.6.4. Recuperación, manejo y maduración de ovocitos.....	29
2.6.5. Técnicas de colección y manejo del COCs de gatas.....	30
2.6.6. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos.....	32
2.6.7. Cultivo de ovocitos con levaduras y minerales orgánicos.....	33

CAPÍTULO III.....	34
METODOLOGÍA.....	34
3.1. UBICACIÓN DEL TRABAJO.....	34
3.1.1. Características del lugar de estudio.....	35
3.2. MATERIAL DE OBSERVACIÓN Y MEDICION.....	36
3.2.1. Material experimental.....	36
3.2.2. Materiales y equipos de recuperación de ovocitos.....	37
3.2.3. Materiales de Manipulación.....	37
3.2.4. Materiales y equipos evaluación.....	37
3.2.5. Materiales y equipo de laboratorio.....	38
3.2.6. Materiales y equipos para maduración <i>in vitro</i> .....	39
3.3. MÉTODOS.....	39
3.3.1. Preparación de medios de recuperación de ovocitos.....	39
3.3.1.1. Preparación solución de dulbecus.....	39
3.3.1.2. Preparación stock de Medio 199 (M-199) + albúmina sérica bovina (BSA en ingles).....	40
3.3.2. Preparación de medios de maduración.....	41
3.3.2.1. Preparación de solución Medio de maduración IVF – TL Fertilización <i>in vitro</i> TL).....	41
3.3.2.2. Preparación de solución Medio de maduración M-199+BSA.....	41
3.3.3. Preparación de solución de fijación.....	42
3.3.4. Preparación de solución de orceína.....	42
3.3.5. Preparación de parafina líquida.....	43
3.4. ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS.....	43
3.4.1. Estandarización de pH .....	43
3.4.2. Filtrado de los medios.....	43
3.4.3. Acondicionamiento del medio ambiente.....	43
3.5. PROCEDIMIENTO.....	44
3.5.1. Colección de ovarios del matadero.....	44
3.5.2. Recuperación de los ovocitos.....	45
3.5.3. Búsqueda de ovocitos.....	46
3.5.4. Cultivo de ovocitos.....	47
3.5.5. Evaluación de las capas del cúmulus oophurus del ovocitos.....	47
3.5.6. Fijación de ovocitos desnudos.....	48
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
3.6.1. Estadígrafo empleado.....	49
3.6.2. Factores de estudio.....	49
3.6.3. Variables de estudio.....	50
3.6.4. Cantidad de folículos y ovocitos.....	50
3.6.5. Cantidad de folículos y ovocitos por semana.....	50
CAPÍTULO IV.....	51
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	51
4.1. TIPOS DE MADURACIÓN DE CELULAS DEL CÚMULUS DEL OVOCITO .....	51
4.1.1. Efecto de las técnicas de recuperación sobre los tipos de maduración de las células del cúmulus .....	51
4.1.2. Efecto de los medios de recuperación sobre los tipos de maduración de las células del cúmulus .....	55

4.1.3. Efecto de los medios de maduración sobre los tipos de maduración de las células del cúmulus.....	58
4.2. MADURACION NUCLEAR DE OVOCITOS.....	62
4.2.1. Efecto de las técnicas de recuperación sobre la maduración nuclear de ovocitos .....	62
4.2.2. Efecto de los medios de recuperación sobre la maduración nuclear de ovocitos .....	66
4.2.3. Efecto de los medios de maduración sobre la maduración nuclear de ovocitos.....	68
CONCLUSIONES.....	75
RECOMENDACIONES.....	76
BIBLIOGRAFIA.....	77
ANEXOS.....	84

## ÍNDICE DE CUADROS

Contenido:	Pág.
CUADRO 1	
FACTORES QUE AFECTAN EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO.....	1
CUADRO 2	
PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE GANADO VACUNO EN LAS AMÉRICAS.....	7
CUADRO 3	
PRINCIPALES PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE LAS VACAS.....	8
CUADRO 4	
MADURACIÓN DE OVOCITOS CULTIVADOS EN LEVADURA.....	33
CUADRO 5	
PREPARACIÓN DE SOLUCION MEDIO DE RECUPERACIÓN DULBECUS...	39
CUADRO 6	
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MEDIO DE RECUPERACIÓN M-199+BSA....	40
CUADRO 7	
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MEDIO DE MADURACIÓN IVF- TL.....	41
CUADRO 8	
PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FIJACIÓN.....	42
CUADRO 9	
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ORCEÍNA.....	42
CUADRO 10	
PREPARACION DE PARAFINA.....	43
CUADRO 11	
SOLUCIÓN PARA CONSERVAR LOS OVARIOS.....	45
CUADRO 12	
DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DEL EXPERIMENTO SEGÚN FACTORES.....	50
CUADRO 13	
OVOCITOS EVALUADOS POR REPETICIÓN SEGUN FACTORES.....	50
CUADRO 14	
EFFECTO DE LAS TECNICAS DE RECUPERACION SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CELULAS DEL CÚMULUS.....	51

CUADRO 15	
EFECTO DE LAS MEDIOS DE RECUPERACION SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CELULAS DEL CÚMULUS.....	55
CUADRO 16	
EFECTO DE LAS MEDIOS DE MADURACION SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CELULAS DEL CÚMULUS.....	58
CUADRO 17	
EFECTO DE LAS TÉCNICAS DE RECUPERACION SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS .....	62
CUADRO 18	
EFECTO DE LOS MEDIOS DE RECUPERACION SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS .....	66
CUADRO 19	
EFECTO DE LOS MEDIOS DE MADURACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS .....	68

### ÍNDICE DE GRÁFICAS

Contenido:	pág.
GRÁFICA 1	
EFECTO DE LAS TECNICAS DE RECUPERACIÓN SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CELULAS DEL CÚMULUS.....	54
GRÁFICA 2	
EFECTO DE LAS MEDIOS DE RECUPERACIÓN SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CELULAS DEL CÚMULUS.....	57
GRÁFICA 3	
EFECTO DE LAS MEDIOS DE MADURACIÓN SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CELULAS DEL CÚMULUS.....	61
GRÁFICA 4	
EFECTO DE LAS TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS .....	63
GRÁFICA 5	
EFECTO DE LOS MEDIOS DE RECUPERACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS .....	67
GRÁFICA 6	
EFECTO DE LOS MEDIOS DE MADURACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS .....	71

### INDICE DE ANEXOS

Contenido:	pág.
ANEXO 1	
TIPOS DE MADURACIÓN DE CÉLULAS CUMULARES SEGÚN FACTORES.....	84

ANEXO 2	
PRUEBA DE $\chi^2$ PARA TIPOS DE MADURACIÓN DE CÉLULAS DEL CÚMULUS A EFECTO DE TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN.....	85
ANEXO 3	
PRUEBA DE $\chi^2$ PARA TIPOS DE MADURACIÓN DE CÉLULAS DEL CÚMULUS A EFECTO DE MEDIOS DE RECUPERACION.....	85
ANEXO 4	
PRUEBA DE $\chi^2$ PARA TIPOS DE MADURACIÓN DE CELULAS DEL CUMULUS A EFECTO DE MEDIOS DE MADURACIÓN.....	85
ANEXO 5	
PRUEBA DE $\chi^2$ PARA MADURACIÓN NUCLEAR A EFECTO DE TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN.....	85
ANEXO 6	
PRUEBA DE $\chi^2$ PARA MADURACIÓN NUCLEAR A EFECTO DE MEDIOS DE RECUPERACIÓN.....	86
ANEXO 7	
PRUEBA DE $\chi^2$ PARA MADURACIÓN NUCLEAR A EFECTO DE MEDIOS DE MADURACIÓN.....	86
ANEXO 8	
OBTENCIÓN DE OVARIOS DE LOS RASTRO DE MATADERO.....	86
ANEXO 9	
RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR PUNCIÓN ASPIRACIÓN.....	87
ANEXO 10	
RECUPERACIÓN DE OVOCITOS POR LA TECNICA SLICING.....	87
ANEXO 11	
MANIPULACIÓN DE OVOCITOS EN MEDIO DE RECUPERACIÓN.....	88
ANEXO 12	
CÁMARA DE CULTIVO CELULAR, ALIMENTADO CON GASES.....	88
ANEXO 13	
CÁMARA DE CULTIVO CELULAR CONTENIENDO EN SU INTERIOR PLACAS PETRI CON OVOCITOS EN PROCESO DE MADURACIÓN.....	89
ANEXO 14	
EVALUACIÓN DE OVOCITOS EN ESTEREO MICROSCOPIO.....	89
ANEXO 15	
OVOCITO SEMI DESNUDO, PERTENECIENTE AL TIPO C.....	90
ANEXO 16	
OVOCITO CON CUATRO CAPAS DE CÉLULAS DEL CÚMULUS, PERTENECIENTE AL TIPO B.....	90
ANEXO 17	
PLACAS CON OVOCITOS SUMERGIDOS EN SOLUCIÓN ÁCIDO GLACIAL ACÉTICO Y ORCEINA.....	91
ANEXO 18	
OVOCITO MADURO CON FORMA CIRCULAR DEFINIDA Y PRESENCIA DEL PRIMER CORPÚSCULO POLAR.....	91

## RESUMEN

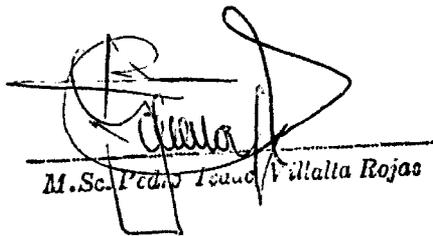
Estudios *in vitro* sobre el desarrollo de gametos femeninos, buscan a acelerar los índices reproductivos de los bovinos por lo tanto su productividad. En este trabajo se cultivó *in vitro* ovocitos de vacas recuperados de ovarios de matadero, para demostrar que se puede trabajar con animales de alta producción láctea, buscando incrementar la cantidad de crías por año/vientre, previa fertilización y transferencia de embriones, por lo tanto el objetivo general planteado en esta investigación fue "Colectar, cultivar y madurar *in vitro*, ovocitos de vacas (*Bostaurus*) en el altiplano boliviano"; con objetivos específicos de: Determinar el efecto de las técnicas de recuperación, medios de recuperación y maduración en los tipos de maduración de las capas del complejo cúmulus oophurus y en la maduración nuclear de ovocitos. Los resultados muestran la maduración de las capas del cúmulus oophurus que con punción aspiración, llegaron a tipos A, B y C con 40; 119 y 129 ovocitos, representando el 7,84 %; 23,33% y 25,29 % respectivamente. Con slicing llegaron a tipos A, B, y C con 39; 104 y 79 de ovocitos, representando el 7.65%, 20,39% y 15,49%; respectivamente. Con el medio de recuperación Dulbeccus, se logró madurar los tipos A, B y C con 43; 100 y 100 ovocitos, representando el 8,43 %; 19,61 y 19,61 % respectivamente. Con el medio de recuperación M-199 + BSA se maduraron los tipos A, B, y C con 36; 123 y 108 ovocitos, representando el 7,06 %; 24,12 % y 21,18% respectivamente. Con el medio de maduración IVF-TL, se logró obtener los tipos A, B y C con 99; 35 y 118 ovocitos, representando el 19,41 %; 6,86 % y 23,14 % respectivamente. Con el medio de maduración M-199+BSA se lograron los tipos A, B, y C con 44; 124 y 90 ovocitos, representando el 8,63 %; 24,31% y 17.65 % respectivamente. En la maduración nuclear de ovocitos, con la técnica de punción aspiración, 113 no maduraron (22.74 %) y 172 sí (34.61 %). Con slicing 67 ovocitos (13.48 %) no maduraron y 145 ovocitos maduraron (29.18%). Con el medio de recuperación dulbecus 87 no maduraron (17.51 %) y 155 sí maduraron (31.19 %). Con el medio de recuperación M-199+BSA 93 ovocitos (18.71 %) no maduraron y 162 sí maduraron (32.60%). Con el medio de maduración IVF-TL, 105 no maduraron (21.13 %) y 137 sí maduraron (27.57 %). Con M-199+BSA 75 (15,09 %) no maduraron y 180 ovocitos maduraron (36.22 %). Por lo tanto se

concluye que para la maduración de las capas de la células del cúmulus oophurus de los ovocitos, las técnicas de recuperación punción aspiración y slicing; y medios de recuperación dulbecus y M-199+BSA tienen el mismo comportamiento; y entre los medios de maduración M-199 + BSA e IVF-TL,el primero es superior estadísticamente en la maduración llegando a los tipos A y B.Para la maduración nuclear del ovocito, con la técnicas de recuperación; Los medios de recuperacióndulbecus y M-199+BSA, tienen igual comportamiento y el mejor medio estadísticamente para la maduración nuclear es el M-199+BSA.

## ABSTRACT

In vitro studies about the female gametes development, seeking to accelerate the reproductive rates of cattle so as their productivity. In this study in vitro cultured oocytes recovered from ovaries of cows slaughtered, to show that is possible to work with high mil production cows, seeking to increase the number of offspring per cow/year, previous fertilization and embryo transfer, therefore the general objective of this research was "to collect, culture and maturation in vitro, oocytes from cows (*Bos Taurus*) in the Bolivian highlands" with specific objectives: To determine the effect of recovery techniques, use of recovery mediums and maturation in different mediums of the layers of cumulus oophorus complex and nuclear maturation of oocytes. The results show the maturation of cumulus oophorus layers using the aspiration puncture to get A, B and C types with 40, 119 and 129 oocytes, representing 7.84 %, 23.33 % and 25.29 % respectively. With slicing to get A, B and C types with 39, 104 and 79 oocytes, representing 7.65 %, 20.39 % and 15.49 % respectively. The recovery with Dulbeccus medium the maturation rates were A, B and C types with 43, 100 and 100 oocytes, representing 8.43 %, 19.61 % and 19.61 % respectively. The recovery with M-199 +BSA medium the A, B and C types were 36, 123 and 108 oocytes, representing 7.06 %, 24.12 % and 21.18 % respectively. With the maturation medium IVF-TL, it was possible to get A, B and C types with 99, 35 and 118 oocytes, representing 19.41 %, 6.86 % and 23.14 % respectively. With the maturation medium M-199 + BSA were to get A, B and C types with 44, 124 and 90 oocytes, representing 8.63 %, 24.31 % and 17.65 % respectively. In the nuclear maturation of oocytes with the aspiration puncture was 172 matured (34.61 %) and 113 did not matured (22.74 %), with slicing method 145 oocytes matured (29.18 %) and 67 did not matured (13.48 %), with the Dulbeccus medium 155 oocytes matured (31.19 %) and 87 did not matured (17.51 %), with the M-199 + BSA medium 162 oocytes matured (32.60 %) and 93 did not matured (18.71 %), with IVF-TL medium 137 oocytes matured (27.57 %) and 105 did not matured (21.13 %), with M-199-BSA medium 180 oocytes matured (36.22 %) and 75 did not matured (15.09 %). The conclusion were: for the maturation of layers from cumulus oophorus of the ovocytes, the technique of recovery for aspiration puncture and slicing and recovery mediums as Dulbeccus and M-199-BSA have the same behavior, and among the maturation mediums M-199-BSA is statistically superior to IVF-TL reaching maturation in types A and B. For oocyte nuclear maturation with the recovery techniques the Dulbeccus and M-199-BSA have the same behavior and the best medium for nuclear maturation was the M-199+BSA.

**Key Words:** Cows. Development female gametes. Maturation of cumulus layer. Nuclear Maturation of oocytes.



M.Sc. Pedro Isaac Villalta Rojas

## INTRODUCCIÓN

Las tecnologías reproductivas tienen gran valor sobre el control endocrino, los cambios moleculares y los procesos metabólicos que regulan el desarrollo temprano de los folículos ováricos. Como tecnología aplicada, ofrece la oportunidad de aumentar el número de descendientes de genotipos superiores. (Gally y Lazzari, 2006). Los indicadores y la eficiencia reproductiva de los bovinos dependen de elevar el nivel cultural y técnico de los ganaderos hasta generar y consolidar criterios y principios sostenibles, fundamentalmente en los aspectos ecológico, económico y social. Crear una conciencia capaz de dar visión sistemática de lo que se pierde por cada día improductivo en una vaca y el impacto social que genera.

Prevenir la infertilidad, es más racional y económico que combatirla. Se debe prestar especial atención al período comprendido entre los 7 meses de preñez y los primeros 150 días posparto garantizando los requerimientos de energía y otros componentes de la dieta. Considerando que en la vaca de 450 Kg, el consumo de alimento no es menos de 12 Kg/día de materia seca, un desajuste en el parto afecta la condición corporal, al desarrollo del feto y se traduce en inactividad ovárica posparto y anestro.

El control hormonal de la reproducción debe realizarse siempre dentro del contexto económico de la crianza, después de realizar un análisis previo de los índices reproductivos de la crianza que permita definir los parámetros técnicos y económicos que interesa mejorar. La producción y rentabilidad en bovinos de leche y carne depende en gran medida del rendimiento reproductivo del rebaño. Incluso en crianzas de alta producción, la consecución del objetivo "un ternero por vaca y año" y por tanto un ciclo productivo anual permite maximizar los ingresos y en la mayoría de los casos, disminuir el costo de producción. Además, una parte se refieren a la utilización más o menos sistemática de hormonas con el fin de mejorar la fertilidad, la detección de celos o la involución uterina, por lo que es importante conocer su implicación económica (Cruz, Z. A., 2006).

La recuperación de ovocitos y su fertilización *in vitro*, es otra realidad en vacas. La obtención de ovocitos maduros a partir de ovarios de animales sacrificados, se demostró que es posible madurar y fertilizar *in vitro* los ovocitos para luego ser congelados y almacenados, para ser transferidos a hembras receptoras, de las cuales se producen crías viables (Segura, *et. al.* 2001).

La técnica de colección de óvulos puede ser más consistente que permita que la producción de embriones sea segura y pueda repetir sin interferir en el ciclo reproductor o en la producción de leche de las donantes. Sin embargo, sólo una minoría de los óvulos recogidos se desarrolla como embriones viables. Los óvulos recogidos de folículo dominante son de menor calidad que los recogidos durante el crecimiento folicular. Diversos estudios demostraron que la maduración *in vitro* (MIV) fue inferior en comparación *in vivo*. Es una consecuencia obvia de la recolección de una población heterogénea de oocitos con diferente potencial de desarrollo, la mayoría de los cuales nunca ovularían o ya están en un estado avanzado de involución (Gally G. y Lazzari A. 2006).

Estudios trataron de mejorar la calidad de los óvulos imitando la última fase de crecimiento del ovocito *in vivo* con un período de maduración *in vitro* (24, 48 horas) antes de la maduración final. Sin embargo, fracasaron. Parece que esto limita cualquier progreso del ganado joven con el que se esperaba conseguir mayor beneficio de ese paso de premaduración. Desde una perspectiva de aplicación, estos resultados son muy importantes porque proporcionan un método para aumentar la flexibilidad de todos los procesos de producción de embriones *in vitro* permitiendo ajustes de tiempo de premaduración-maduración en la fecundación *in vitro* (Bó, *et. al.* 2006).

Las posibilidades de aplicación de la tecnología *in vitro* son múltiples y presentan un elevado interés para su aplicación en el ganado bovino. Esta se encuentra actualmente en un estado de desarrollo avanzado debido a los medios sintéticos son cada vez más adaptados a los requerimientos específicos del ovocito bovino y cumpla necesidades metabólicas durante las primeras fases de su desarrollo (Monforte, C. 2003).

## CAPITULO I

### PROBLEMÁTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Durante el proceso de crianza del ganado, existen factores que frenan el incremento sostenible de la eficiencia productiva entre los que se destacan altos índices de mortalidad y bajos índices de natalidad. La mortalidad del ganado tiene la base fundamental en la desnutrición o subnutrición seguida por las enfermedades parasitarias o infecciosas; la baja natalidad por la temible infertilidad del ganado que de forma temporal o definitiva impide el crecimiento y prolificidad de los rebaños. La reproducción del ganado vacuno, tiene tres eslabones débiles (cuadro 1) que determinan la baja prolificidad, la baja natalidad y en consecuencia el decrecimiento y la baja producción de leche y carne, estos son:

CUADRO 1  
FACTORES QUE AFECTAN EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO

DEL ANIMAL	AMBIENTE	MANEJO
Anatomía y Fisiología	Longitud del día	Registros
Genética	Temperatura	Sistema de manejo
Endocrinología	Lluvia	Detección de celos
Factores seminales	Humedad	Habilidad ganadera
Ritmos biológicos	Clima	Nutrición
Salud-enfermedad	Mecanización	Alimentación
Problemas del parto	Sala de ordeño	Sanidad
Comportamiento	Tamaño del hato	Rentabilidad
Edad 1er parto	Composición del hato	Política empresarial
Nro. Lactancia y Edad		Capacitación
Rendimiento lechero		
Condición y Tamaño corporal		

Fuente: Cruz, Z. A. 2006.

La incorporación tardía de las novillas a la reproducción, generalmente no cumple con los requerimientos alimenticios de los animales durante el

desarrollo y conducen a una edad tardía al primer parto ocasionando de inicio la pérdida de un ciclo reproductivo. El Periodo de servicio, días abiertos o parto-gestación prolongado determinan periodos interpartales económicamente desfavorables con la pérdida de una lactancia y una cría en cada ciclo además de distorsionar el flujo reproductivo del rebaño.

El índice de supervivencia del rebaño, por debajo del 50 % en la mayoría de los ganaderos determina altos índices de mortalidad en etapas tempranas de la vida. Si se considera que por cada 100 partos aproximadamente 50 son hembras, y que de estas apenas 25 llegan a adulta con las limitaciones planteadas vemos otras de las razones fuertes para el decrecimiento de la masa adulta potencialmente productiva, por no contar con animales suficientes para el reemplazo. Estos aspectos débiles de la REPRODUCCION del ganado vacuno son generalmente los que frenan comúnmente el desarrollo de la ganadería en América Latina y el Caribe (Cruz, Z. A., 2006).

El impacto de ovocitos o embriones *in vitro* es su aplicación en el mejoramiento genético, que permite el aprovechamiento de ovarios de las vacas que van para el camal. Elimina las vacas viejas vacías, que van a venta, pero antes de enviarlas a su destino, estas pueden ser castradas y los ovarios destinarse al laboratorio de producción de ovocitos *in vitro*. Los ovocitos obtenidos por ovario pueden ser fecundados con semen de alto valor genético. Obteniéndose aproximadamente 300 ovocitos de 50 ovarios, lográndose entre 90 y 100 embriones, y en consecuencia, entre 25 a 35 terneros. Para lograr esta misma cantidad de terneros por medio de la inseminación artificial tradicional, es necesario inseminar aproximadamente entre 50 a 60 vacas, o sea, utilizar 50 a 60 pajuelas del mismo toro (Aller, J. 1992).

La producción de embriones a partir de ovocitos obtenidos de vacas de alto mérito, ofrece nuevas perspectivas para la aceleración del progreso genético, esta técnica se practica con ritmos de colección intensiva (2 veces/semana durante 2 meses consecutivos) sobre hembras gestantes o vacías, e independientemente de su normalidad reproductiva, debido por la gran cantidad de folículos inmaduros dispuestos a madurar a efecto de estímulos

hormonales. Asimismo, la fertilización *in vitro* (FIV) representa un medio para la producción de embriones a bajo precio a partir de ovarios de matadero para ser utilizados con fines de estudio (desarrollo embrionario temprano, transgénesis, clonación) o con propósitos comerciales (Mucci, *et. al.* 2006).

Hay por lo menos dos razones para producir embriones de bovino *in vitro*: La primera es que se producen grandes cantidades de embriones para la transferencia comercial, como en el caso de Europa y Japón, donde el valor del ganado lechero (vacas) es menor que el ganado de carne, por lo que es un incentivo económico la transferencia embriones de ganado de carne producido *in vitro* en vacas productoras de leche. En la práctica, los ovocitos son recuperados de vaquillas productoras de carne en el rastro, seleccionadas de lotes de engorda como ganado de alta calidad de una raza deseada, luego los ovocitos son fertilizados *in vitro* con semen de un toro altamente seleccionado y posteriormente los embriones se desarrollan *in vitro* o en el oviducto de una hembra hasta el estadio de mórula o blastocisto, en el cual se transfieren a las vacas receptoras, que son usualmente vacas lecheras. La segunda razón es la posibilidad económica de clonar embriones por transferencia nuclear, en la que se requiere que los ovocitos enucleados sean fertilizados *in vitro* y que el nuevo cigoto sea desarrollado *in vitro* hasta un estadio apropiado para reclonar y sea un técnica muy económica (Rivas, C. R. 2011).

Los bovinos constituyen un recurso genético importante en el ecosistema. Su valor más alto reside en la capacidad de acomodación al ambiente. Para alentar su preservación y promover su evolución, se debe tener en cuenta su capacidad de resistencia al medio (ecológico, económico y social). En síntesis, es combinar la capacidad adaptativa con los requerimientos de producción y productividad del mercado moderno (Müller y Gelman, 1981).

Las eficiencias de la maduración *in vitro* de ovocitos y embriones se inició el año 1981, donde nació el primer ternero procedente de un embrión producido *in vitro*, esta técnica ha experimentado una evolución considerable. En la actualidad se aplica para mejorar el potencial reproductivo de las vacas donantes dentro de los programas reproductivos y en algunas ocasiones

sustituye a la utilización de la superovulación. Las estadísticas indican que el año 2003 se obtuvieron 330.000 embriones bovinos a nivel mundial mediante fecundación *in vitro*, y que fueron transferidos 106.200, lo que representa el 14,2% del total de los embriones transferidos; demostrando numerosas aplicaciones, según Herradón, *et. al.* (2007):

- Aumentar el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético, este procedimiento permite obtener ovocitos en novillas de más de 6 meses de edad y en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las 2-3 semanas del parto.
- Esta técnica no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de la hembra donante, además, evita la necesidad de utilizar gonadotropinas.
- Permite producir embriones a muy bajo coste, lo que permite transferir embriones de razas cárnicas en vacas de aptitud láctea no destinadas a la cría o utilizarlos para tratar la infertilidad derivada de problemas de ovulación, fecundación o mortalidad embrionaria precoz.
- Permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades (tuberculosis, brucelosis, leucosis, etc.).
- Permite el aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad: machos con oligospermias severas, hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital.
- Incrementa de la eficacia de los procedimientos de selección, mediante la aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variantes alélicas de algunos genes de interés productivo.
- Facilita la utilización más eficiente de semen sexado.

Los trabajos de cultivo *in vitro* de embriones, permiten emplear los órganos (ovarios) sin mermar los animales vivos, reduciendo los esfuerzos en el manejo de hembras excedentes o no aptas para la reproducción y ampliando la disponibilidad de recursos, entre otros. También coadyuvarán a desarrollar biotecnología en la reproducción bovina. A nivel macroregional, tiene el potencial de incrementar los ingresos económicos ya sea a nivel municipal, departamental hasta nacional. Por lo tanto reducir las demandas de carne o leche en la alimentación humana (IICA, 2002).

El empleo de ovarios recuperados del camal, es una técnica que permite optimizar económicamente el recurso genético, considerando que son animales en descarte destinados a esta por varias razones, entre las cuales se considera el hecho de que en una producción cualquiera se considera el 10 % de animales destinados a la saca, no arriesgar el valor genético de los animales que aun cumplen su rol reproductivo para el sustento de las familias productoras de bovinos (Aller 1992). Por esta razón, en esta investigación se planteó como objetivo general "Colectar, cultivar y madurar *in vitro*, ovocitos de vacas (*Bos taurus*) en el altiplano boliviano"; cuyos objetivos específicos son:

- 1.- Determinar el efecto de las técnicas de recuperación, medios de recuperación y maduración en los tipos de maduración de las capas del complejo cúmulus oophurus.

- 2.- Determinar el efecto de las técnicas de recuperación, medios de recuperación y maduración en la maduración nuclear de ovocitos.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. LA GANADERÍA BOVINA**

El ganado bovino es considerado el pilar fundamental de la producción pecuaria en todas o casi todas las áreas del planeta gracias a sus peculiaridades en el tubo digestivo que les permiten transformar las materias vegetales en proteínas de alto valor biológico además de otras producciones importantes (Cruz, Z. A. 2006).

La carne y leche de bovino forma parte de la dieta integral alimenticia de la humanidad, esto es principalmente por el alto valor nutricional que representan. Sin embargo, para producir mayor cantidad de carne y leche segura y sana, es necesario modificar e implementar nuevas prácticas de producción pecuaria (Figueroa, *et. al.*, 2008).

La vaca lechera produce 5,000 kg. de leche por lactancia más que hace 50 años, pero tiene 30% menos fertilidad. La vaca de doble propósito también tiene más exigencias de producción de leche y mayores pesos al destete en caso de vacas de cría. Debido al incremento en los costos de producción, el ganadero se ha visto forzado a mejorar su eficiencia productiva y a resolver la problemática reproductiva del ganado bovino (Sintex, G. 2005).

##### **2.1.1. El ganado bovino en Latinoamérica**

En América Latina y el Caribe cuenta con el 26% del inventario de ganado vacuno del mundo y tiene que alimentar el 8% de la población mundial,

mientras que China con el 7% de la tierra del mundo debe alimentar el 22% de la población mundial, con una economía creciente, lo que ha influido en la modificación de los hábitos de consumo. La producción media de kg de leche/vaca por campaña en América Latina y el Caribe es de 1188 kg, en América del Norte 6775 kg, Europa 4540 kg y Oceanía 3728 kg, lo que evidencia la reserva productiva que tiene la región; nuevas posibilidades surgen para la adopción de tecnologías y prácticas de manejo que permitan expresar la reserva productiva que la región atesora. Según reportes aproximados de la FAO, en el mundo existen más de 1 200 millones de cabezas de ganado vacuno: Asia, Sur América y África son los continentes con mayores poblaciones, sin embargo no con los mejores índices de productividad y consumo (Cruz, Z. A., 2006).

### 2.1.2. Principales países productores de ganado vacuno

Los principales países productores de ganado vacuno a escala mundial son la India, Brasil, la Comunidad de Estados Independientes, con poblaciones que oscilan entre 100 y 193 millones de cabezas aproximadamente; les siguen con cifras altas China, Argentina y Etiopía. Del continente Americano se destacan además México y Colombia.

**CUADRO 2**  
**PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE GANADO VACUNO EN LAS AMÉRICAS**

<b>Países</b>	<b>Existencia</b>
1. Brasil	151.600.000
2. E.U.	100.988.000
3. Argentina	50.000.000
4. México	30.702.000
5. Colombia	25.700.000
6. Venezuela	15.071.000
7. Canadá	12.306.000
8. Uruguay	10.316.000

Fuente: Cruz, Z. A., (2006).

En la Producción de carne bovina en las Américas se destacan EU, Brasil y Argentina.

## 2.2. REPRODUCCIÓN BOVINA

Los beneficios del manejo reproductivo planificado en bovinos lecheros incluyen la predeterminación de la fecha de parto y por lo tanto de la producción; la posibilidad de facilitar la implementación de la inseminación artificial reduciendo las tareas en relación a la detección de celo e incrementando la eficiencia reproductiva global del establecimiento.

La adopción de sistemas de manejo de los ciclos estrales en los bovinos lecheros adquiere hoy mayor importancia dada la necesidad de hacer eficientes los sistemas productivos, aumentando la producción durante la vida útil del animal, tratando de reducir los intervalos parto concepción logrando de esta manera aumentar el número de días productivos de los animales.

La introducción de un manejo reproductivo planificado provoca una mejora en la eficiencia reproductiva de los rodeos. Es necesario entonces recordar los parámetros usados para evaluarlos, así como los objetivos a lograr:

**CUADRO 3**  
**PRINCIPALES PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE LAS VACAS**

<b>Parámetros</b>	<b>Objetivos</b>
Intervalo entre partos	12.4 - 12.7 meses < 13
Servicios por concepción	< 2.2 veces
% de vacas preñadas con 3 o menos servicios	85 - 88 %
Intervalo parto concepción	< 110 días

Fuente: Sintex, G. 2005.

De los parámetros planteados, los más utilizados para evaluar los programas de manejo reproductivo son los días abiertos o el de intervalos parto concepción. El día abierto implica pérdidas de ingresos por más días de lactancia, más días de seca y menos terneros por año. El día abierto en vacas normales está compuesto por el puerperio fisiológico que son los días necesarios para que aparezca un primer celo después del parto, que es un promedio de no menos de 45 y un máximo de 60 días. El llamado Período de espera voluntario, no puede ser modificado sustancialmente porque responde a variables fisiológicas. Los otros componentes de los días abiertos están

originados en fallas en la detección de celos y fallas en la concepción, lo cual implica, en ambos casos adicionar 21 días del nuevo ciclo estral a los días abiertos. Por todo lo expuesto la justificación principal de la introducción de un programa de manejo reproductivo radica en la optimización de la detección de celos y la mejora en las tasas de concepción (Sintex, G. 2005).

### **2.2.1. La función reproductiva del ganado lechero**

En la ganadería contemporánea es necesario entender la teoría de la regulación de las funciones sexuales sobre la base de los conocimientos científicos, el cual posibilita dirigir y organizar la crianza, así como valorar y resolver con éxito las perturbaciones reproductoras del ganado, desde el punto de vista etiológico, terapéutico y profiláctico. Como resultado de los sistemas eficientes de producción, la vaca está sometida a mayor estrés. Si se deja de luchar por mantener un intervalo entre partos adecuado, se dejará de ser eficiente y rentable (Wattiaux, M. 2004).

### **2.2.2. Generales del tracto reproductivo de la vaca**

El tracto reproductivo de la vaca se encuentra localizado debajo del recto, el último segmento del intestino grueso. El útero, oviducto y ovarios se encuentran suspendidos en la cavidad abdominal por medio del ligamento ancho. La posición de este ligamento le permite al útero alojar al feto en crecimiento (Wattiaux, M. 2004).

#### **2.2.2.1. Vagina**

La vagina es un tubo aplastado, de normalmente 30 cm de largo. Es el lugar de deposición del semen durante el servicio natural. La vagina sirve como un pasaje para los instrumentos utilizados para inseminación artificial y para la salida del feto durante el parto.

#### **2.2.2.2. Cervix**

El cervix es un fuerte músculo de alrededor de 10 cm de largo y 2,5 a 5 cm de diámetro. Interiormente está conformado por un angosto canal. El canal se encuentra usualmente cerrado (y sellado en la preñez) excepto durante el celo y el parto. El cervix es una "puerta de control" que evita a cualquier material extraño invadir el útero y lo aísla del mundo exterior (Wattiaux, M. 2004).

#### **2.2.2.3. Útero**

El útero es la parte del tracto reproductivo donde el feto en desarrollo es mantenido. En una vaca no preñada, el cuerpo del útero es de menos de cinco centímetros de largo, y posee cuernos izquierdo y derecho que se curvan como los de un carnero. El útero es un órgano muscular capaz de una enorme expansión para alojar al feto en crecimiento. Hacia el final de la preñez, el útero contiene un ternero de 35 a 40 kg, 20 a 30 kg de fluídos, y cinco kg de placenta. Luego del parto, toma aproximadamente 40 días para que el útero y otras partes del aparato reproductivo alcancen nuevamente el tamaño no gestante, proceso es llamado involución.

#### **2.2.2.4. Oviductos**

Los oviductos son dos tubos contorneados que unen cada uno de los cuernos del útero con el ovario respectivo; tienen más de 20 cm de largo y solamente 0,6 cm de diámetro. Al final de cada oviducto se abre en una estructura en forma de embudo (infundíbulo); esta colecta al óvulo que es liberado del ovario durante el celo. La fertilización, o la unión de un óvulo con un espermatozoide, suceden en el oviducto. El embrión permanece en el oviducto por tres o cuatro días antes de desplazarse al útero. Este período de tiempo es necesario para que el útero se prepare a sí mismo para recibir al feto en crecimiento.

### **2.2.2.5. Ovarios y el óvulo**

En una vaca no preñada, los ovarios son ovales (forma de huevo), de cerca de cuatro a seis cm de largo y dos a cuatro cm de diámetro. Las funciones más importantes del ovario son:

- Producir un óvulo maduro cada 21 días cuando la vaca posee un ciclo estral normal.
  
- Secretar hormonas que:
  - Controlan el crecimiento del óvulo dentro del ovario
  - Cambian la conducta de la vaca durante el celo
  - Preparan el tracto reproductivo para posibles preñeces

Uno de dos estructuras predominan en la superficie del ovario: ya sea el folículo que contiene al óvulo maduro o el cuerpo lúteo (cuerpo amarillo) que crece de lo que queda del folículo luego de que el óvulo fue liberado.

El óvulo en contraste con todas las otras células del cuerpo, el óvulo posee una sola copia de la información genética de los cromosomas. Los óvulos son encontrados en el ovario antes del nacimiento, pero la maduración del mismo comienza con la madurez sexual en la pubertad (12 a 14 meses de edad) junto con el comienzo de los ciclos estrales.

## **2.3. FISILOGIA DEL COMPLEJO CÚMULUS OOFURUS**

### **2.3.1. Maduración nuclear y citoplasmática del ovocito**

Al nacimiento de la hembra, los ovocitos de las especies mamíferas están bloqueados en la fase G2 (diploteno) de la profase de la primera división meiótica y tienen que reiniciar y completar la meiosis y la maduración para que la fecundación pueda llevarse a cabo. La competencia meiótica, o la capacidad de los ovocitos para reiniciar y completar la meiosis, se adquiere

progresivamente durante el crecimiento folicular y ovocitario y está asociada a una serie de cambios nucleares y citoplasmáticos. Los principales cambios nucleares incluyen la ruptura de la vesícula germinal (GV), condensación cromosómica y progresión a metafase I (MI), extrusión del primer corpúsculo polar y bloqueo en la metafase de la segunda división meiótica (MII). In vivo, el reinicio de la meiosis es provocado por el pico preovulatorio de LH. In vitro, el reinicio de la meiosis y la maduración tienen lugar de manera espontánea después de retirar físicamente al ovocito del folículo. En el ovocito bovino, solo aquellos que provienen de folículos de un diámetro superior a 2 mm son meióticamente competentes. Por el contrario, aquellos ovocitos con un diámetro inferior o los ovocitos corticales no adquieren totalmente la competencia meiótica. De hecho, algunos de estos ovocitos son capaces de realizar una meiosis parcial llegando hasta MI, pero pocos son capaces de llegar hasta MII y, menos aún, de desarrollarse hasta estadio de blastocisto. Durante la maduración citoplasmática existe una reorganización de los organelos citoplasmáticos, comienza la síntesis de proteínas específicas y se produce un incremento de la actividad de las quinasas, iniciándose complejas cascadas de fosforilación y desfosforilación de proteínas específicas que involucran a numerosas quinasas como el metaphase promoting factor (MPF), la familia de las mitogen-activated protein kinases (MAPK, MAPKK, MAPKKK), el factor citostático (CSF), el AMPc y el receptor del epidermal growth factor (EGFR). Se cree que estas cascadas de fosforilación activan moléculas reguladoras nucleares y ooplasmáticas, dando la capacidad del ovocito para ser fecundado in vitro hasta el estadio de blastocisto (Alvarracín, J. 2005).

El glutatión (G) del ovocito es sintetizado durante la primera meiosis (meiosis I). Si se bloquea la síntesis de G durante su desarrollo, disminuye el potencial de fecundación del ovocito. La maduración del citoplasma del ovocito incluye procesos como la síntesis de compuestos bioquímicos, fosforilación de proteínas o la activación de rutas metabólicas. La síntesis de G forma parte de esta maduración, por tanto, requerida para una fecundación y desarrollo embrionario. El G actúa sobre los microtúbulos y su polimerización, y por consiguiente, sobre la formación del huso acromático gracias a la diamida (Rausell F. y Tarín J., 2005).

El glutatión reducido (GSH) es utilizado como almacenamiento y transporte de cisteína, participa también en la síntesis de DNA y proteínas. Es la principal defensa no enzimática de las células frente al estrés oxidativo ocasionado principalmente por factores como el envejecimiento, exposición a tóxicos, el propio metabolismo, etc. El GSH está constituido por tres aminoácidos,  $\gamma$ glu-cys-gly, y su síntesis tiene lugar en el citoplasma celular en dos pasos: se une el glutamato con la cisteína, reacción catalizada por la glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y se une la glicina con la cisteína, reacción catalizada por la glutatión sintetasa (Rausell F. y Tarín J., 2005).

### **2.3.2. Bloqueo meiótico y reinicio de la meiosis**

*In vivo*, el pico preovulatorio de LH libera al ovocito de su primer bloqueo meiótico conduciéndolo a su segundo bloqueo meiótico en MII. La progresión desde el primer al segundo bloqueo meiótico se denomina maduración ovocitaria y a partir de aquél, el ovocito está listo para ser ovulado y fecundado. Producto de la fecundación se produce la activación del ovocito que le provocará la salida del segundo bloqueo meiótico. Los mecanismos que produce el bloqueo meiótico y su reinicio no está claramente establecidos, pero probablemente dependen de factores procedentes de las células foliculares. Entre estos factores foliculares es el AMPc y las purinas. Se ha sugerido que el AMPc producido por las células de la granulosa y transportado al ovocito es el responsable de la inhibición de la meiosis *in vivo*. La fosforilación de las proteínas mediante la proteína quinasa A dependiente de AMPc, parece ser el mecanismo de acción por el cual el AMPc inhibe el reinicio de la meiosis (Alvarracín, J. 2005).

Durante la maduración nuclear se produce un incremento de la actividad de las quinasas, iniciándose cascadas específicas de fosforilación y desfosforilación del MPF (maturation-promoting factor o metaphase-promoting factor) y la actuación de la MAPK (mitogen-activated protein kinase), responsables de la progresión meiótica, siendo esta última quinasa un factor crítico en la regulación del inicio de la meiosis. El MPF es un miembro del grupo de las quinasas dependientes de ciclinas. Esta serina treonina quinasa está formada

por la unidad catalítica p34cdc2, homóloga a la proteína quinasa cdc2 de la levadura, y por la subunidad reguladora ciclina B. Durante la fase de crecimiento de los ovocitos, las dos subunidades forman un preMPF fosforilado en los residuos treonina 161, treonina 14 y tirosina 15 de la subunidad p34cdc2. Al inicio de la maduración nuclear, se activa el dímero a través de la desfosforilación específica del residuo tirosina 15. Esta desfosforilación está catalizada por la proteína fosfatasa cdc25.

La actividad del MPF puede ser determinada mediante el análisis de la actividad de la histona H1 quinasa intrínseca a esta proteína. La actividad de la histona H1 quinasa se ve incrementada a las 6 y 20 horas de haber comenzado la maduración, llegando a su primer pico de actividad durante la MI, para posteriormente decrecer durante la anafase I. La actividad de la enzima muestra un segundo pico mínimo durante el estadio de MII. La condensación de la cromatina, en ovocitos porcinos, ocurre independientemente de la activación del MPF. La p34cdc2 ejerce una profunda influencia en la condensación de la cromatina en ovocitos bovinos mientras y la condensación de la cromatina se da sin que exista la activación del MPF. La MAPK, una quinasa serina/treonina, es un principal factor que regula la maduración ovocitaria. La MAPK es activada por la MAPK-quinasa (MAPKK) la cual es, a su vez, fosforilada por varias quinasas aunque, en los ovocitos, el producto del proto-oncogen c-mos es probablemente el que juega el principal papel. La activación del MPF y la MAPK, los cuales comparten sustratos incluyendo proteínas implicadas en la formación de la membrana nuclear, condensación de la cromatina y formación del huso, provocan el reinicio, la progresión y el bloqueo de la meiosis en MII. Una actuación inapropiada o la presencia de bajos niveles de estas quinasas, puede afectar negativamente a la capacidad de desarrollo de los ovocitos (Alvarracín, J. 2005).

### **2.3.3. Inhibición del reinicio de la meiosis**

*In vivo*, los ovocitos llevan a cabo la maduración citoplasmática durante el crecimiento folicular, periodo caracterizado por una gran síntesis de RNAm y de proteínas necesarias para el reinicio de la meiosis y primeros estadios

posteriores a la fecundación. Por el contrario, en los sistemas *in vitro*, el reinicio de la meiosis es inducido espontáneamente por la transferencia de ovocitos meióticamente competentes a medios de cultivo, retirándolos así de su ambiente folicular. Si bien estos ovocitos son capaces de completar la meiosis, no son capaces de realizar la maduración introplasmática de manera adecuada, lo cual se verá reflejado en su menor capacidad de fecundación y desarrollo embrionario, debido a que probablemente se ha privado a estos ovocitos de factores que se producen en etapas tardías del crecimiento folicular. Se ha hipotetizado que si los ovocitos son cultivados *in vitro* antes de su maduración en condiciones que mantengan el bloqueo meiótico en vesícula germinal, éstos pueden tener la oportunidad de madurar citoplasmáticamente y adquirir mayor capacidad para el desarrollo embrionario (Alvarracín, J. 2005).

#### **2.3.4. Características de un ovocito maduro**

Un ovocito alcanza la madurez tanto citoplasmática como nuclear. La madurez nuclear se pone de manifiesto con el reinicio de la primera división meiótica hasta metafase II, y se evidencia con la extrusión del primer corpúsculo polar. La madurez citoplasmática se observa, de forma indirecta por la uniformidad del citoplasma, junto con el grado de expansión de las células de cúmulo y el aumento del espacio perivitelino. Ambos procesos son necesarios para una adecuada fecundación y desarrollo embrionario. Los ovocitos inmaduros recuperados en estadio de profase I con presencia de vesícula germinal (VG), procedentes de folículos que todavía no han sufrido la dominancia, son madurados en un medio específico para la maduración hasta que alcanzan metafase II (Tur, *et. al.* 2007).

#### **2.3.5. Importancia del cúmulus oofurus**

Ovocitos madurados *in vitro* y vitrificados en presencia de células del cúmulo sobreviven morfológicamente en mayor proporción, lo que indica que las células del cúmulo ejercen un efecto protector contra los daños crioinducidos. Por otra parte, la tasa de maduración obtenida en los ovocitos congelados con

células del cúmulo permite evidenciar que éstos lograron conservar mejor las configuraciones cromatínicas normales (Bellaris, *et. al.*, 2005).

## **2.4. TÉCNICAS ARTIFICIALES DE RECUPERACIÓN DE COCs**

La técnica de recuperación de ovocitos por aspiración laparoscópica directa de ovarios de animales vivos, como de ovocitos recuperados de ovarios de matadero, requiere de un cultivo "*in vitro*" para uso en programas de FIV. Los embriones se producen a partir de óvulos (ovocitos) recuperados de ovarios provenientes de animales que se envían a faena. Por cada vaca (2 ovarios recuperados) se pueden obtener entre 15 a 20 óvulos, lo que permitirá obtener de 4 a 6 embriones para transferir. La otra alternativa para la obtención de óvulos de animales vivos consiste en la aspiración de los folicúlos ováricos con ayuda de la ultrasonografía y una bomba de vacío (Gonzales, *et. al.* 2007).

### **2.4.1. Obtención de los ovocitos**

Según Herradón, *et. al.* (2007), mencionan que la obtención de los ovocitos se realiza a través de dos procedimientos básicos:

- A partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folicúlos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm.
- A partir de animales vivos utilizando la aspiración transvaginal ecoguiada (OPU). Esta técnica permite recoger ovocitos en las hembras de más de 6 meses de edad, durante los primeros 3 meses de gestación y a partir de las 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de 6 meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopía.

#### **2.4.2. Morfología del ovocito inmaduro para cultivo *in vitro***

Lorenzo, P. G. (1992), describe que los ovocitos deben seleccionarse según los siguientes criterios:

- El ovocito, aislado de su folículo, presenta un núcleo grande, situado periféricamente, rodeado de la membrana nuclear y con un nucleolo apenas visible, en los ovocitos bovinos. Este estado nuclear se corresponde con el estadio de dictiato meiótico (GV).
- Los orgánulos citoplásmicos se distribuyen por todo el citoplasma de la célula y así las mitocondrias se localizan en la periferia, mientras que en posición central se encuentran gránulos corticales, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y vesículas lisosomales.
- El espacio perivitelino (EPV) no existe o es muy pequeño y la zona pelúcida se encuentra atravesada por las prolongaciones de las células de la corona radiada, constituyéndose como uniones intercelulares ("gap junctions"). Estas uniones llegan incluso hasta el interior del ovocito y sirven como "puente" de unión entre éste y las células del cúmulo que le rodean y, también entre ellas mismas. Estas vías de comunicación celular pueden ocupar hasta el 1 % de la superficie total de la membrana plasmática del ovocito. El ovocito inmaduro presenta el cúmulo celular compacto e incluso dificulta la visión del propio ovocito.

#### **2.4.3. Desarrollo Morfológico del oocito durante la maduración**

El inicio de la maduración está marcado por cambios nucleares y citoplásmicos que ocurren en periodos de tiempo distintos según, la especie. En oocitos bovinos, entre las 3 y 6 horas del comienzo de la maduración, comienzan los cambios en el núcleo del oocito que culminan con la desaparición de la membrana nuclear (GVBD). De 12 a 16 horas, se llega al estadio de metafase 1 y de las 19 a las 24 horas se produce la extrusión del primer corpúsculo polar

al EPV, llegando rápidamente al estadio de metafase II, donde se detiene nuclearmente la meiosis, en espera de que ocurra la fecundación.

Los cambios citoplásmicos a lo largo de este periodo se resumen en una elevada actividad de síntesis proteica y una reordenación de los sistemas de microtúbulos, debido a la intensa actividad cromosómica. Además, también existe un agrupamiento de las mitocondrias y los gránulos corticales que comienzan a situarse periféricamente. Por lo que respecta a las uniones intercelulares, comienzan a retraerse a las 3 horas de iniciada la maduración y a las 18 horas sólo quedan restos de las mismas en el Epitelio Perivitelino EPV), quien a la vez que progresa la maduración, se hace cada vez mayor.

Entre las 10 y 12 horas, del comienzo de la maduración, el cúmulo que rodea el oocito comienza su expansión, que llega a ser máxima a las 18 horas del inicio del cultivo. La expansión se debe a la mucificación entre las células, por la presencia de ácido hialurónico en la matriz intercelular y también, a la posible presencia de un factor desconocido que favorece la expansión y que se transfiere desde el mismo oocito hasta el cúmulo (Lorenzo, P. G., 1992).

#### **2.4.4. Morfología del oocito maduro**

Los criterios para calificar como oocito maduro y listo para ser fertilizado, lo describe Lorenzo P.G. (1992):

- Se caracteriza por la expansión total del cúmulo celular y por la presencia del primer corpúsculo polar en el EPV. A nivel nuclear, los cromosomas presentan la configuración de metafase II.
- Los cambios citoplásmicos no se completan hasta las 30 horas de haber comenzado la maduración, aunque nuclearmente la maduración finaliza a las 24 horas. Estos cambios citoplásmicos incluyen, sobre todo, dos procesos: la colocación de los gránulos corticales a la periferia, situándose bajo la membrana plasmática, y el agrupamiento de mitocondrias. En esta fase final de la maduración, sigue existiendo una

alta actividad de síntesis proteica con el fin de preparar al ovocito, nuclear y citoplásmicamente, para la fecundación.

Estos fenómenos cronológicos, descritos en la maduración se corresponden tanto en los oocitos madurados *in vivo* como *in vitro*. Las diferencias más notables entre ambos tipos de maduración, estriban fundamentalmente en que los oocitos madurados *in vitro* sufren por un lado, un retraso en la migración de los gránulos corticales a la periferia del oocito y por otro, presentan un mayor número de prolongaciones celulares, provenientes de las células de la corona radiada, en el EPV. Por lo tanto, los criterios que aseguran que ha ocurrido la maduración *in vitro* pueden resumirse en:

- 1.- Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II.
- 2.- Expansión y mucificación del cúmulo celular.
- 3.- Traslado de los gránulos corticales a la periferia del oocito.
- 4.- Desaparición de las uniones intercelulares.

#### **2.4.5. Características de oocitos seleccionados**

La selección de los oocitos considerados aptos para maduración *in vitro* se establece en función de los siguientes criterios:

- Deben poseer un citoplasma con un granulado fino y uniforme.
- El ooplasma debe llenar completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.
- Aquellos oocitos que presentan un acusado espacio perivitelino, el citoplasma retraído, abundante vacuolización o la zona pelúcida rota, no son considerados aptos para el estudio y se eliminan.
- Las células del cúmulus que rodean el oocito deben presentarse en capas celulares uniformes y compactas, no deben estar ni expandidas ni dispersas.
- No deben presentar aglutinaciones celulares y deben permitir la distinción del ovocito y la zona pelúcida.

## **2.4.6. Criterios de clasificación y denominación de los COCs**

### **• Denominación por categorías y calidad**

Los complejos cúmulus ovocitos (COCs) son evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías:

- Completamente rodeados por  $\geq 3$  capas de células de cúmulus con citoplasma homogéneo eventualmente granulado.
- Ovocitos rodeados con  $< 3$  capas de células del cúmulus y citoplasma generalmente homogéneo.
- Ovocitos desnudados y citoplasma con apariencia irregular con zonas oscuras.
- Ovocitos con cúmulus expandido y/o citoplasma irregular.

Los COCs se clasifican como viables (calidad I y II), para los procesos de maduración y fertilización in vitro (Gallegos y Mellizo, E. 2006).

### **• Denominación por tipos**

Seleccionados los oocitos, se clasifican en tres categorías, según la morfología del cúmulo de células que lo rodean (Lorenzo, P. 1992):

- Oocitos tipo A. Presentan un cúmulo con más de 5 capas de células.
- Oocitos tipo B. Están rodeados tan sólo por 3-5 capas celulares.
- Oocitos tipo C. Se encuentran desnudados o parcialmente desnudados de células del cúmulus.

La maduración de cada tipo de oocitos siempre se realiza de manera independiente de los otros tipos.

- **Denominación por categorías**

Los ovocitos se clasifican como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la MIV, basándose en las características de las células del cúmulus oophorus y corona radiada y la homogeneidad del citoplasma (Sanchez, R. y Silva, J. 2003):

Los ovocitos categoría I (excelentes) presentan citoplasma oscuro uniforme combinado con 5 o más capas compactas del cúmulus:

Ovocitos categoría II (buenos) presentan citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero menos de 5 capas del cúmulus.

Ovocitos categoría III (regulares) presentan una pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas del cúmulus presentes son menos compactas.

Ovocitos categoría IV (malos) presentan citoplasma no homogéneo o fragmentado y las células de la corona y del cúmulus se encuentran disgregadas o ausentes en su totalidad (Sanchez R. y Silva, J. 2003).

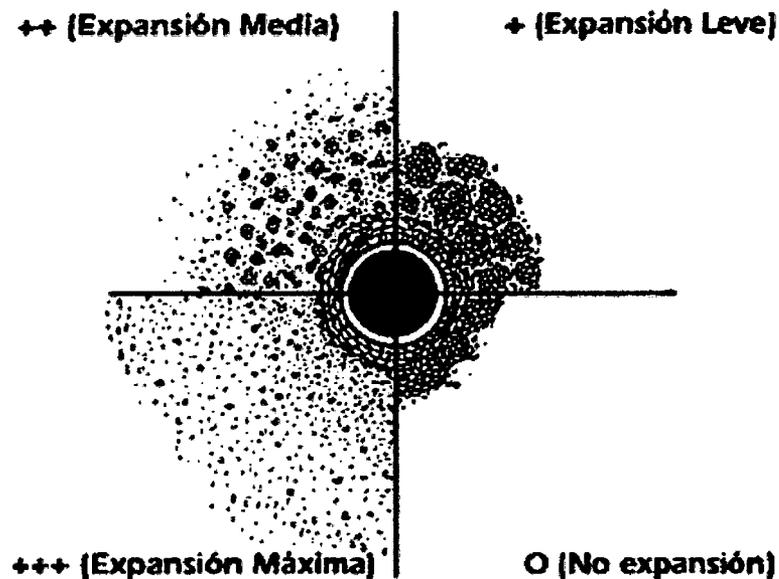
#### **2.4.7. Expansión del cúmulus celular**

El criterio de expansión del cúmulus (figura 2) es el siguiente (Lorenzo, P. G. 1992):

Expansión nula. No existe expansión apreciable del cúmulo.

- 1.- Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del oocito.
- 2.- Expansión apreciable, de unos dos diámetros del oocito.
- 3.- Expansión máxima, de más de tres diámetros del oocito, e incluso de las células de la corona radiada.

FIGURA 1  
VALORACIÓN DE EXPANSIÓN DEL CÚMULUS



## 2.5. CONSIDERACIONES PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo tienen que reunir condiciones biofísicas y elementos inorgánicos más importantes que son los siguientes:

- Osmolaridad. Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280,20 mOsm/Kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario.
- pH. La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados in vitro desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7,2 y 7,6.
- CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO<sub>2</sub> en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviducto de hembras mamíferas.

- El agua participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está muy relacionado con el desarrollo ovocitario y embrionario. Las fuentes utilizadas son agua de lluvia, la obtenida por sucesivas destilaciones, o actualmente la producida por sistemas de purificación que utilizan el principio de ósmosis reversa. 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).

### **2.5.1. Método de cultivo de ovocitos**

Se debe coleccionar ovarios de ovejas o marranas del matadero lo más fresco posible, estos son colocados y lavados con solución fisiológica a 35 °C. Durante la aspiración de folículos visibles (> 2mm) se aspira el contenido folicular empleando la jeringa con aguja. Este es colocado en placas petri cuadrada. Terminada la aspiración folicular, se iniciará la búsqueda de los ovocitos utilizando un microscopio estereoscopio a 20 X. Una vez ubicados los ovocitos, (complejo cúmulus ovocitos, (COCs) serán aspirados y trasladados a una placa petri de 35 mm, con medio limpio, donde serán evaluados en estereoscopio a un aumento de 40 X – 60 X (Gallegos A. y Mellizo G., 2006).

### **2.5.2. Protocolo de recuperación y maduración de ovocitos (COCs)**

Según, Hansen P. J. *et al.* (2002), describe los protocolos desarrollados en la Universidad de Florida, departamento de ciencia animal:

#### **2.5.2.1. Colecta de ovarios**

1.- Se remueve los ovarios del aparato reproductor de las vacas, inmediatamente se deposita los ovarios en los termos.

2.- Al coleccionar los ovarios se separa la grasa, tejido y sangre, masajeadolos en el contenedor, inmediatamente después colocarlos en los contenedores y estos en los termos.

3.- Luego se llevan los ovarios al laboratorio de inmediato.

#### **- Colecta de Ovocitos (COCs)**

#### **Material y Equipo Necesario**

- Incubadora (con dispositivo para 5% CO<sub>2</sub>, a 38.50 °C)
- Cámara de flujo laminar
- Pipeteador de 100 microlitros y puntas para Pipeteador
- Medio de Maduración de Complejo Ovocitos Cúmulus más Suplemento
- Aceite mineral
- Placa Falcón de 60 X15 (Platos Petri)
- Pipetas Pasteur Plásticas
- 1 botella de Medio de Recolección de COCs (OCM 400 ml) + suplemento pre calentado a 38.50 °C
- 1 l de Solución Salina + Penicilina/Estreptomicina pre calentado a 38.50 °C

#### **Preparación para Colectar los COCs**

- Bisturí
- Placa Petri con micro gotas de medio de maduración + suplementos, inmersas en aceite vegetal y equilibradas mínimo dos horas antes a 38.50 °C y 5% de CO<sub>2</sub>
- Papel para cubrir la superficie de la mesa en la campana de flujo laminar
- Placa X
- Placa Petri cuadrículada
- Filtro Celular Falcón de 100 micras
- Tubos de 50 ml para centrifuga, con tapa de cierre hermético
- Vaso volumétrico 400 ml/estéril
- Laminilla térmica 38.50 °C
- Microscopio de disección
- Estufa de baño maría a 38.50 °C
- Pipetas de transferencia
- Jeringuilla estéril de 10 ml

- Aguja calibre 18 gaus
- Vaso volumétrico de 50 ml

## **Procedimiento**

Según Machicado R. (2009), existen varios protocolos, en las cuales existen muchos aspectos en común:

1.- se prepara 1 litro, de solución salina más el suplemento 3 horas antes de que lleguen los ovarios al laboratorio, en la estufa a 38.50 C.

El medio de lavado y recolección, y las microgotas de Maduración se preparan antes que los ovarios lleguen al laboratorio para lavarlos inmediatamente. Se deben tener suplementado el Medio de Maduración de Ovocitos, una hora antes de la expectativa de llegada de los ovarios.

2.- Dos horas antes se prepara los materiales necesarios, Preparados los platos de 60 X 15 conteniendo las microgotas de 50 micro litros de medio de cultivo cubiertas de aceite mineral, se prepara cuantas gotas se estime necesario considerando colocar solo 10 ovocitos por gota.

3.- Llegando los ovarios al laboratorio, se lavan con un masaje severo hasta que la solución salina tornada rojiza por la sangre se aclare con dos o tres cambios de esta (la solución salina debe estar precalentada a 38.50 C, que es mejor para quitar la sangre a los ovarios), enseguida de lavarlos se colocan en un contenedor plástico de 1 litro. Que contenga solución salina a 38.50 °C (mientras dura la colección de los COCs).

4.- Adicionar el medio de recolección de COCs al vaso volumétrico de 400 ml, de la botella que lo contiene.

5.- Sujetar los ovarios por la base con una pinza de hemostasia firmemente, se debe diseccionar el exceso de tejido y grasa de la base sujeta del ovario luego limpiarlo en el papel que cubre la base de la cámara, incidir los folículos

con el bisturí en 2 y 3 milímetros en sentido vertical, luego repetir la operación en sentido horizontal, por todo el ancho y largo del ovario (no incidir folículos de 10 y más milímetros ni cuerpos lúteos).

6.- Sumergir los ovarios dentro del medio de recuperación y agitar vigorosamente, para que el ovario suelte los COCs, repetir el proceso para cada ovario, (después de agitar presionar en las paredes del vaso volumétrico) y exprimir. Un vaso volumétrico anticipa un resultado de 10 ovocitos por cada ovario trabajado, algunas veces se obtienen hasta 20 o 30 de cada uno.

7.- Después de la recolección de los COCs el medio conteniéndolos, se coloca en tubos cónicos de 50 mililitros de centrifuga esterilizados, dependiendo de los que se requiera para ello, procurando no llenar más de 45 mililitros por tubo para poder maniobrar posteriormente sin derramar. Se utilizan los tubos que se requieran dependiendo del medio que contenga el vaso volumétrico de 400 ml donde son diseccionados y lavados los ovarios.

8.- Se coloca los tubos conteniendo los COCs y medio de recolección en baño maría (38 °C) por mínimo 5 minutos para que precipiten los COCs,

9.- Mientras los COCs se asientan (precipitan), se coloca el medio de maduración en un vaso volumétrico de 100 ml, se llena una jeringa de 10 ml que sirve para lavar el filtro celular sobre la placa de Petri, donde son recibidos los COCs que fueron filtrados, la placa contiene antes 2 ml de medio precalentado donde se recibe lo filtrado, (COCs y medio de cultivo precalentado en la estufilla e incubadora a 38.50 °C).

10.- Se usa pinzas fórceps para sujetar el filtro celular de 100 micras y colóquelo sobre un vaso volumétrico esterilizado de 100 ml, usando una pipeta Pasteur plástica esterilizada, aspirando el pellet de COCs del fondo del tubo cónico de centrifuga que los contienen.

Lentamente se deposita lo aspirado dentro del filtro celular, tres tubos de medio conteniendo los COCs deben ser filtrados en cada proceso; teniendo

precaución de no atascar o derramar el separador (filtro celular), enjuagando el filtro con medio de maduración y lavándolo.

11.- Inmediatamente regrese el filtro y con la jeringuilla de 10 ml (con aguja de No. 18) conteniendo el medio de maduración riegue la base del filtro y las paredes con el invertido, sobre la placa que contiene medio de maduración precalentado en la platina térmica para la localización. Si es necesario procesar más de 3 tubos de ovocitos, el tamiz del filtro celular puede ser reutilizado después de terminar el paso 11.

12.- Recolectar los Complejos Cúmulus Ovocitos (COCs) lo más posible para prevenir los adversos efectos del shock térmico (frío). Solo los COCs que tienen cúmulos completo y compacto en la célula y el citoplasma granuloso con la zona pelúcida bien marcada, sin espacios limpios deberán usarse para ser colectados y ser utilizados en los pasos subsecuentes, este procedimiento se efectúa en las placas X que contienen OCM. Continúe lavando y transfiriendo los COCs en cada compartimento de la placa X.

13.- Transferir los COCs a cada compartimento de la placa X dejando atrás los desechos, cada paso llevarlos lo más limpios posible, repetir la operación, después de lavar por dos o tres veces los COCs deben quedar sin despojos.

14.- Los COCs lavados, son transferirlos a las microgotas de 10 a 50 microlitros de OMM (Medio de Maduración de Ovocitos). Y con el menor medio posible colocarlos en las microgotas, e inmediatamente incubarlos en el medio de maduración, así es posible obtener un máximo desarrollo. Incubar por 18 – 24 horas a 38.50 C° y 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.5.2.2. Tiempo y medios de Maduración *in vitro***

La maduración *in vitro* constituye una etapa decisiva en el rendimiento del proceso de producción de embriones *in vitro*. Sin embargo, se ha prestado una escasa atención, ya que en muchos laboratorios se continúa empleando 24 horas para cultivar los ovocitos inmaduros en TCM-199, suplementado con un

10% de suero fetal, gonadotropinas (FSH y LH), y 17  $\beta$ -estradiol, a una temperatura de de 38,5° C en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire. No obstante, existen claras evidencias de que los ovocitos madurados *in vivo* tienen una competencia para el desarrollo notablemente superior a los madurados *in vitro*.

Cuando las condiciones en las que se produce la maduración son muy desfavorables, se observa el bloqueo de la meiosis y de la fecundación. Sin embargo, cuando el sistema empleado tiene pequeñas imperfecciones sus efectos no se manifiestan hasta la segmentación o la formación de blastocistos y en muchos casos no se observan hasta después de la implantación. Se ha comprobado recientemente que el cultivo de los gametos y de los embriones en condiciones inapropiadas induce cambios epigenéticos en el genoma embrionario y en la expresión génica (Herradón, *et. al.* 2007).

## **2.6. EXPERIENCIAS DE TRABAJOS DE MADURACIÓN**

### **2.6.1. Recuperación ovocitaria de bovinos**

El contenido folicular aspirado se deposita en placas Petri. Luego de cada aspiración la jeringa se lava 2 veces con el mismo medio fosfato bufer salino (PBS) para asegurar la recuperación de los ovocitos desde cada folículo aspirado. El medio proveniente de la aspiración y de 2 lavados sucesivos fue observado bajo estereoscopio para recuperación y evaluación de los ovocitos a un aumento de 20X.

### **2.6.2. Maduración de ovocitos de bovinos**

Los ovocitos transportados a goteros de maduración de 50  $\mu$ l, en grupos de 10 a 12 ovocitos por gota. El medio de maduración utilizado es TCM-199 adicionado con 10 % Suero de ternero, gentamicina (50  $\mu$ g/ml), piruvato de sodio (0.2 mM), FSH (0.08  $\mu$ g/ml), LH (1  $\mu$ g/ml), y estradiol (1 $\mu$ g/ml). Las gotas fueron recubiertas por aceite mineral (Calderón, R. 2005).

El procedimiento normal de maduración fue por 24 h a 38.5° C con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad saturada. Los ovocitos del tratamiento, se incubaron por 6 h, luego se desnudaron parcialmente con un pipeteo suave de las células del cumulus en medio PBS con suero fetal bovino (SFB) al 5 % para quedar aproximadamente con dos a tres capas de células. Posteriormente fueron lavados en medio de maduración a 38.5° C para ser devueltos a sus respectivas gotas de maduración hasta completar las 22 h de cultivo (Calderón, R. 2005).

### **2.6.3. Fijación y Tinción de ovocitos**

Una vez completado el periodo de 24, 36 y 48 h de maduración, los ovocitos serán traspasados a un tubo Eppendorf con el mínimo de PBS para extraer mecánicamente las células del cúmulus, por 3 minutos. Posteriormente se depositarán los ovocitos con la cantidad mínima de medio en un porta objeto (no más de 20 por porta objeto) para ser cubiertos con un cubre objeto con parafina sólida en los 4 extremos.

Una vez montados los ovocitos en el porta objeto se fijaron en alcohol-acético por 12 h. Al transcurrir las 12 h se sacó el porta objeto del fijador, secando la superficie interna para cubrir los ovocitos con orceína acética al 1 % por 15 minutos. Finalmente se dejó escurrir la solución decolorante (ácido acético glacial, glicerol, agua destilada) hasta alcanzar transparencia y se sellaron los cubre objetos al porta objeto con cutex (Calderón, R. 2005).

### **2.6.4. Recuperación, manejo y maduración de ovocitos**

Los ovocitos aspirados de folículos de 3 a 8 mm de diámetro por medio de una aguja 18-g acoplada a una jeringa de 10 ml. El contenido de la aspiración es colectado en tubos plásticos de 15 ml, el cual se deja decantar por 5 minutos mantenido en un baño de agua a 39 °C. Luego con una pipeta Pasteur se aspira el fondo del tubo colocando el material en placas Petri plásticas. Se procede a la búsqueda y selección de los complejos cúmulo-ovocito (COC) con

estereoscópico a un aumento de 15x. Solamente ovocitos rodeados por un cúmulo compacto y citoplasma homogéneo es utilizado para el cultivo.

Previo a la maduración, los ovocitos son lavados manualmente con pipeta Pasteur 3 veces en 2 ml de fosfato buffer salino (FBS) suplementado con 100 UI/ml penicilina-100 µg/ml de estreptomicina y albúmina bovina de vacas gestantes 0,3 % y 3 veces con 2 ml de medio de maduración constituido por TCM 199 (M199) suplementado con hormona foliculo estimulante 0,08 µg/ml (NIH-FSH-P1); estradiol 1µg/ml; piruvato de sodio 0,2 mM; sulfato de gentamicina 50 µg/ml.

De 10 a 12 ovocitos son colocados en gotas de 50µl de medio Dulvecco depositadas en una placa de Petri plástica, las cuales serán cubiertas con aceite mineral y finalmente incubadas a 39 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad relativa de 95 % durante 22 horas. Luego de este período, una muestra de los ovocitos es teñida con orceína acética al 1 % para verificar maduración nuclear (metafase y primer corpúsculo polar) (Ratto, *et. al.* 1999).

#### **2.6.5. Técnicas de colección y manejo del complejo COCs en gatas**

En gatas sin información de la fase del ciclo, con pesos que fluctuaron entre 2 y 3,5 kg, las cuales fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: a) Grupo FSH (n = 9), administración cada 24 horas de 5 mg NIH de FSH (Folltropin-V, Vetrepharm; Canadá), vía subcutánea por 4 días consecutivos. b) Grupo Control (n = 12), administración cada 24 horas de 1 mL de suero fisiológico (Na Cl 0,9%), vía subcutánea por 4 días consecutivos.

Veinticuatro horas transcurridas se realizó la ovario-histerectomía (OH). Las gatas fueron anestesiadas utilizando una asociación de ketamina 20 mg/kg y xilacina 2 mg/kg. Inmediatamente después de la cirugía los ovarios fueron recuperados y depositados en tubos con solución fisiológica y antibióticos (penicilina sódica: 0,08 g/l y estreptomicina: 0,1 g/l) a aproximadamente 37°C, y dentro de 4 horas post-cirugía fueron transportados al laboratorio.

Con el propósito de liberar los COCs los ovarios fueron lavados y posteriormente rebanados mediante finos cortes con bisturí (slicing) en una placa con PBS conteniendo 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA). El medio decantado, proveniente del rebanamiento de los ovarios, fue observado bajo lupa estereoscópica para la recuperación y evaluación de los COCs.

El criterio de clasificación de los COCs se fundamentó en aspectos morfológicos de las células del cúmulo oophorus y la corona radiada, así como en la homogeneidad del citoplasma del ovocito según criterios previamente definidos para esta especie (Sánchez, *et. al.* 2006):

Categoría I: citoplasma oscuro uniforme, núcleo redondo, con 5 o más capas compactas de células de la granulosa.

Categoría II: citoplasma oscuro uniforme conjuntamente con una corona radiada completa pero rodeada por menos de 5 capas de células de la granulosa.

Categoría III: pérdida de la uniformidad del citoplasma, la corona radiada se presenta incompleta y las capas de células de la granulosa son menos compactas.

Categoría IV: citoplasma no homogéneo o francamente fragmentado y las células de la corona y de la granulosa disgregadas o ausentes en su totalidad.

De acuerdo a esta clasificación, los ovocitos fueron clasificados como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la MIV. En base a este criterio se seleccionaron los COCs aptos para MIV, siendo transferidos a una placa de cultivo conteniendo el siguiente medio de maduración: TCM 199; 0,4% BSA; gentamicina 50 µg/mL; piruvato 0,2 mM; 17-betaestradiol 1 µg/ml; LH 1 µl/ml (Lutropin-V,); FSH 1 µl/ml (Folltropin-V) (Sánchez, *et. al.* 2006).

### **2.6.6. Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos**

Los ovarios fueron obtenidos en matadero y almacenados en termo a 35°C con solución salina fisiológica al 0,9 %, suplementada con 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Los ovocitos son aspirados mediante punción de folículos de 3 a 8 mm de diámetro por medio de una aguja 18-g acoplada a una jeringa de 10 ml. El contenido de la aspiración, son colectados en tubos plásticos de 15 ml, el cual se dejó decantar por 5 minutos mantenido en un baño de agua a 39 °C. Luego con pipeta Pasteur se aspiró el fondo del tubo colocando el material en placas Petri. La búsqueda y selección de los complejos ovocito cúmulus (COC) por medio de un microscopio estereoscópico a un aumento de 15x. Solamente ovocitos rodeados por un cúmulo compacto y citoplasma homogéneo se utilizaron para el cultivo.

Los ovocitos son lavados manualmente con pipeta Pasteur 3 veces en 2 ml de fosfato buffer salino (FBS) suplementado con 100 UI/ml penicilina-100 µg/ml de estreptomina y albúmina bovina sérica 0,3 % y 3 veces con 2 ml de medio de maduración constituido por TCM 199 (M199) suplementado con suero fetal bovino inactivado 10 % (SFB), hormona folículo estimulante 0,08 µ g/ml (NIH-FSH-P1); estradiol 1µg/ml; piruvato de sodio 0,2 mM; sulfato de gentamicina 50 µg/ml. De 10 a 12 ovocitos fueron colocados en gotas de 50µl de medio depositadas en una placa de Petri, y cubiertas con aceite mineral y finalmente incubadas a 39 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad relativa de 95 % durante 22 horas. Luego de este período, una muestra de los ovocitos fue teñida con orceína acética al 1 % para verificar maduración nuclear (metafase y primer corpúsculo polar) (Ratto, *et. al.* 1999).

Los ovocitos fueron depositados en grupos de aproximadamente 5 en gotas de maduración de 25 µl cubiertas con aceite mineral y cultivados por un período de 24 horas a 38,5°C en ambiente saturado de humedad con 5% de CO<sub>2</sub>. Completado el período de maduración, los ovocitos fueron extraídos de las gotas de cultivo para la remoción mecánica de las células del cúmulus oophorus y fijación por 24 h en ácido acético-etanol (1:3), luego fueron teñidos

con aceto-orceína (1% de orceína en ácido acético 45%) por 30 minutos y a continuación se procedió a aclarar los ovocitos mediante solución decolorante.

Los ovocitos teñidos se evaluaron con microscopio de contraste de fase y el criterio para evaluar la maduración ovocitaria fue la presencia de la placa II metafásica y el primer corpúsculo polar. Los ovocitos que no presentaron las características anteriores se consideraron como inmaduros y aquellos ovocitos fragmentados o de forma irregular se consideraron como degenerados (Sánchez, *et. al.* 2006).

### 2.6.7. Cultivo de ovocitos con levaduras y minerales orgánicos

La mayoría de los ovocitos colectados en los diferentes tratamientos fueron clasificados como calidad 1 (C1) y en una menor proporción, los de calidad 2 (C2) y 3 (C3). Si bien es conocido que los ovocitos están en metafase II cuando ocurre la ovulación, éstos son captados por la fimbria que rodea al ovario siendo conducidos *hacia el oviducto* (González, E. *et. al.* 2007).

CUADRO 4  
MADURACIÓN DE OVOCITOS CULTIVADOS EN LEVADURA

	TA levaduras	TB Levaduras + minerales	TT control
Ovocitos C1*	66 (84,6 %) <sup>a</sup>	39 (72,2%) <sup>b</sup>	30 (88,2 %) <sup>b</sup>
Ovocitos C2*	9 (11,5%) <sup>a</sup>	9 (17,0 %) <sup>a</sup>	1 (3,0 5) <sup>a</sup>
Ovocitos C3*	3 (3,9%) <sup>a</sup>	10 (18,9 %) <sup>a</sup>	3 (8,8 %) <sup>a</sup>

\* % respecto al total de ovocitos recuperados. C1, C2, C3: ovocitos 1,2 y 3. (a,b) letras diferentes en la fila indican diferencia significativa (P<0,05).

Fuente: González E. *et. al.* 2007.

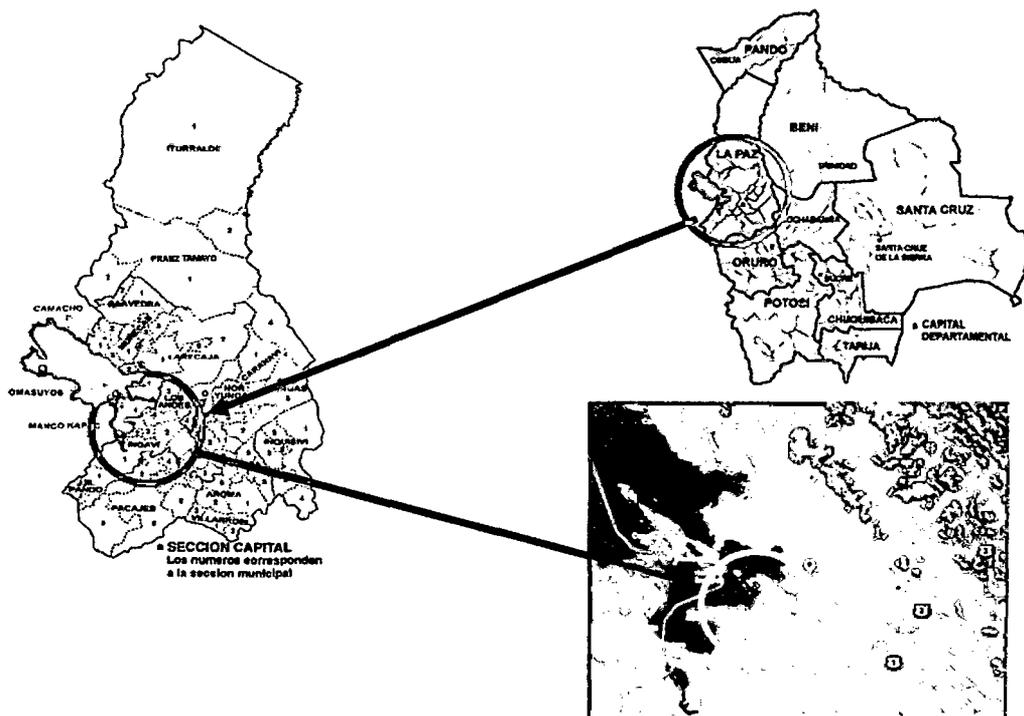
## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1. UBICACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo, se realizó en el laboratorio de reproducción Animal de la Unidad Académica Campesina de Tiahuanacu en la comunidad de Achaca, de la Universidad Católica Boliviana, localizado en la Provincia Ingavi del Departamento de La Paz, ubicado a 72 km de la ciudad de La Paz (carretera a La Paz Desaguadero), entre las coordenadas: Latitud sur:  $16^{\circ} 00'$  y  $16^{\circ} 21'57''$  Longitud oeste: entre los paralelos  $68^{\circ} 13' 15''$  y  $68^{\circ} 4'54''$  y a una altura de 3873 msnm (PDM municipio de Tiahuanacu, 2006 - 2010).

FIGURA 2  
LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



### **3.1.1. Características del lugar de estudio**

#### **✓ Características climáticas**

El municipio de Tiahuanacu está localizado en la Provincia Ingavi del Departamento de La Paz, Bolivia. Es considerada como zona de alta radiación, vientos fuertes, que originan una intensa evaporación del lago Titicaca, favoreciendo la formación de masas nubosas permitiendo la precipitación pluvial en el propio lago y en las zonas cercanas. Las áreas de la zona presentan sub cuencas importantes que vierten sus aguas al lago Titicaca.

La precipitación pluvial promedio anual es de 481 mm, la humedad relativa promedio anual del 65.8 %. La distribución de lluvias es marcada desde diciembre a marzo como los más húmedos y entre abril a noviembre como meses de poca precipitación. La temperatura media anual es de 7.1° C y las heladas son frecuentes a partir del mes de abril a agosto. El clima, pertenece a una zona de vida sub-húmeda influenciando por el lago Titicaca.

#### **✓ Suelo**

Tiahuanacu, tiene suelos de serranías con pendientes rectilíneas largas y moderadamente disecadas, los suelos en las laderas son muy superficiales, color pardo oscuro, textura franca, con subsuelo gravoso pedregoso, presentan afloramiento rocosos y gravas piedras franco arenosos, franco limosos, franco arcillosos limosos, arcillosos arenosos de la clase IV, V, VI, VII, VIII, en muchas áreas, con reacciones suavemente ácidas a leve alcalinas.

#### **✓ Vegetación**

El suelo está cubierta con pastizales y gramíneas, arbustos como thola, quishuara, pajonales y otras especies nativas; destinada a pastoreo de bovinos y ovinos. La flora del lago está predominada por plantas superiores como el *Hydrocotyle*, *Elodea*, *Ranúnculos*, *Myriophyllum*, *Zannichella*, *Ruppia*, *Schoenoplectus*, *Lilaeopsis*, *Azolla*, *Lemna*, entre otras. Los fondos tienen

abundancia de algas carofíceas (*Chara*, *Lamprothamnium*, *Nitella*, *Tolupella*), que constituye la masa vegetal más resaltante.

#### ✓ **Fauna**

El plan de desarrollo municipal de Tiahuanacu (2006 - 2010), menciona que tiene variedad de especies silvestres y domésticas, entre ellas: bovinos, ovinos, cóndores, perdices, liebres, patos silvestres, así como especies endémicas.

#### ✓ **Ganadería**

En la región de Tihuancu, se encuentran alrededor de trece mil bovinos, se estima que aproximadamente 300 toneladas son destinadas para la producción de carne, la ganadería existente está representada por especies criollas cruzadas y adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, la producción lechera está destinada al auto consumo y la venta en ferias.

### **3.2. MATERIAL DE OBSERVACIÓN Y MEDICION**

#### **3.2.1. Material experimental**

Se trabajaron con 116 ovarios de vacas faenados en el matadero, bajo los siguientes criterios:

##### **Criterios de inclusión**

Vacas de boca llena (8 dientes permanentes)

Vacas de cruzas holstein

Folículos comprendidos entre 3 a 8 mm

##### **Criterios de exclusión**

Se descartó ovarios de vacas con tres dientes o menores

No se consideró ovarios izquierdos ni derechos

No se consideró ovarios con úteros gestantes

No se consideró ovarios menores a 2 cm de diámetro ni mayores a 8 cm.

### **3.2.2. Materiales y equipos de recuperación de ovocitos**

200 ml de Medio Dulbecus atemperado a 38° C.

200 ml de M-199 + BSA

Jeringas de 10 ml con aguja de 18 gauss

Platos petri de plástico

Hojas de Bisturí

### **3.2.3. Materiales de manipulación**

1 Cámara de flujo laminar

1 Estereo microscopio de 40 a 60 X

1 Estufa de cultivo

1 Autoclave

2 Termómetro

1 Baño María

1 Balanza digital de 0.0001 g

2 Matraces de vidrio de 100 ml

2000 ml Dulbecus PBS (buffer fosfato salino)

3 lt de agua destilada (Laboratórios Vita)

50 Micro pipetas de transferencia

24 Placas petri de plástico de 8 cm y 3 cm

### **3.2.4. Materiales y equipos de evaluación**

100 Porta objetos

100 Cubre objetos

20 ml Parafina líquida para los pedestales

300 ml Solución de fijativo (ácido acético glaciar)

300 ml Solución de tinción (orceína)

50 Micro pipeta de transferencia

1 Estereo microscopio de 40X

1 Microscopio de 20 a 60X

1 Rejilla de fijación de muestras

- 1 Cámara de flujo laminar
- 10 Micro pipeta de vidrio para manipulación de ovocitos

### **3.2.5. Materiales y equipo de laboratorio**

- 1 Microscopio
- 1 Balanza digital de 0.0001 g de precisión
- 1 Baño maría
- 1 pHmetro
- 2 Espátulas
- 1 Estufa de cultivo
- 1 Micro pipetas
- 1 Pipetas
- 20 Tubos ependorf
- 6 Vasos precipitados de 20 ml
- 8 Vasos precipitados de 100 ml
- 2 Vasos precipitados de 250 ml
- Tubos de ensayo de 5 ml
- 100 unidades Porta objetos
- 100 unidades Porta objetos
- 3 Mecheros
- 2 Autoclave
- 1 Campana de flujo laminar
- 10 Filtros de 0.8 – 0.2 mm
- 15 Jeringas con agujas n° 18
- 10 Pipetas de manipulación
- 5 Pipetas de 3 ml
- 1 Rollo Papel filtro
- 1 Rollo Papel tornasol pehachímetro
- 1 litro Alcohol etílico
- 10 Espátula de laboratorio

### 3.2.6. Materiales y equipos para Maduración *in vitro*

1000 ml medio IVF-TL atemperado a 38° C.

200 M – 119 + BSA

20 Micro pipetas de manipulación de ovocitos

1 Cámara de flujo laminar

30 Platos petri de 3.5 mm

1 Rollo de parafilm sellador

1 Estéreo microscopio

1 Estufa de cultivo

20 Pipeta y tips de 100 µl

20 Pipeta y tips de 1000 µl

1 Cámara de cultivo celular

1 Tanque de mezcla trinaría gaseosa (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)

### 3.3. MÉTODOS

Las soluciones y medios que se emplearon para realizar el presente trabajo, se prepararon secuencialmente y según los pasos a realizar.

#### 3.3.1. Preparación de medios de recuperación

##### 3.3.1.1. Preparación de solución dulbecus

CUADRO 5  
PREPARACIÓN DE SOLUCION MEDIO DE RECUPARACION DULBECUS

Cantidad	Descripción
1000 ml	Agua destilada
9.6 g	Dulbecus Fosfato Buffer Salino
4 g	Albúmina Sérica Bovina
0.1 mg	Cloruro de Calcio
20 µl /50 ml de solución	Solución de gentamicina

Fuente: Limachi, F. 2008.

La preparación del dulbecus fosfato buffer salino se realizó, teniendo en cuenta la asepsia durante el proceso dentro la cámara de flujo laminar que

emitía rayos ultravioleta, el mismo que tiene por objetivo reducir la proliferación de microorganismos patógenos.

La preparación se realizó midiendo 200 ml de agua destilada en una probeta de capacidad de 1000 ml, se añadió 9.6 g de dulbecus fosfato buffer salino, más 0.1 mg de cloruro de calcio (Ca Cl<sub>2</sub>), siendo homogenizado con una varilla de vidrio, luego se añadió un total de 4 g de Albúmina Sérica Bovina más 4 ml de antibiótico (gentamicina) posterior a esto se añadió agua destilada, hasta llegar a un total de 1000 ml de solución de dulbecus fosfato buffer salino.

La solución de dulbecus se estandarizó con ácido clorhídrico de 0.1 N y/o hidróxido de sodio de 0.1 N dejando con pH de 7.15 ligeramente alcalino. Una vez estandarizado la solución se procedió a filtrar la solución en fibra mili por 0.8/0.2 µ, con la ayuda de jeringas de 20 ml, depositando en matraz aforado, una vez filtrado la solución se selló y se conservó a 8 °C.

### 3.3.1.2. Preparación de solución Medio-199 (M-199) + albúmina sérica bovina (BSA en ingles)

CUADRO 6  
PREPARACIÓN DE SOLUCION MEDIO DE RECUPERACION M-199+ BSA

Cantidad	Descripción
1000 ml	Agua destilada inyectable
9.6 g	M-199
10 m M	HEPES: N- (2-hidroxietyl) piperazina - N -2- ácido etanol sulfónico
4 g	Albúmina sérica bovina
20 µl/ 50ml de Solución	Solución de Gentamicina

Fuente: Limachi, F. 2008.

La preparación de la solución M-199 +BSA, se realizó dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas.

Se mide 200 ml de agua destilada, añadiendo 9.6 g de M-199+BSA, seguidamente se añadió 4 g de Albúmina Sérica Bovina, y 10 mM de HEPES, más 4 ml de solución de Gentamicina, se complementó con agua llegando a 1000 ml. La solución de M-199+BSA se estandarizó con ácido clorhídrico de

0.1 N y/o hidróxido de sodio de 0.1 N dejando con pH de 7.15 ligeramente alcalino, para no causar daños celulares.

Se filtró la solución M-199 en fibras milipore de 0.8/0.2  $\mu$ , con la ayuda de una jeringa de 20 ml, se filtró el total de la solución. Se selló con papel parafilm para conservar a 8 °C.

### 3.3.2. Preparación de medios de maduración

#### 3.3.2.1. Preparación de solución Medio de maduración IVF – TL (fertilización *in vitro* TL)

CUADRO 7  
PREPARACIÓN DE LA SOLUCION DE MEDIO DE MADURACIÓN IVF- TL

cantidad g/l	descripción
6,662	Na Cl
0,236	K Cl
0,042	NaH <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub>
0,294	Ca Cl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O
0,102	Mg Cl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O
4 ml de 5,25 % de solución	NaHCO <sub>3</sub>
0,142 ml	Na Lactato (60 %)
0,110 ml	Na piruvato (20mg/ml)
0,6 g	BSA libre de grasa
0,5 ml	Gentamicina
500 ml	Agua destilada

Fuente: Limachi, F. 2008.

En un recipiente de capacidad de 500 ml, se llenó 250 ml de agua destilada, colocando los reactivos pesados en el recipiente, se selló el recipiente con parafilm y se agitó hasta disolver y homogenizarlo completamente, posteriormente se enrazó a 500 ml.

En una jeringa se cargó 4 ml de IVF-TL y se mezcló con 0.4 ml de albúmina sérica bovina (BSA) para la preparación de las gotas de maduración.

#### 3.3.2.2. Preparación de solución Medio de maduración M-199 + BSA

Este medio de maduración es el mismo medio empleado para la recuperación.

### 3.3.3. Preparación de solución de fijación

Para la preparación del fijativo, se utilizó los insumos en proporción 1 a 3. Cantidad de insumos para la preparación de 400 ml de solución fijativo.

CUADRO 8  
PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FIJACIÓN

Cantidad	Descripción
100 ml	Acido acético glacial
300 ml	Alcohol a 95%

Fuente: Limachi, F. 2008.

La solución se preparó en un frasco ámbar, posteriormente almacenado a temperatura ambiente excluido de los otros reactivos por ser una solución oleosa y volátil cuya función principal es de eliminar las acumulaciones de grasa intracelular, el mismo que puede dificultar la observación de la maduración nuclear.

### 3.3.4. Preparación de solución de orceína

CUADRO 9  
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ORCEÍNA

Cantidad	Descripción
1 g	Orceína
40 ml	Acido acético glacial
55 ml	Agua destilada

Fuente: Limachi F. 2008.

Para la preparación de la solución de orceína, se pesó en balanza de precisión la orceína y en una probeta de precisión los volúmenes necesarios de acido acético glacial y agua destilada, en proporciones descritos en el cuadro anterior. Donde primero se disolvió el acido acético glacial más la orceína, el homogenizado se logró hirviendo la disolución con movimientos constantes al cual se agregó agua destilada, para luego ser almacenado a 4 °C.

### 3.3.5. Preparación de parafina líquida

La mezcla de parafina más cera se realizó en proporción de 1:3. Para mezclar se empleó calor, el mismo se cargó en jeringas de 10 ml con aguja de 18 gauss desprovistas de bisel. Posteriormente al cargado se almacenó a temperatura ambiente.

CUADRO 10  
PREPARACIÓN DE PARAFINA

Cantidad	Descripción
100 g	parafina
300 g	cera

Fuente: Limachi, F. 2008.

## 3.4. ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

### 3.4.1. Estandarización del pH

Mediante la ayuda del pH metro se reguló los medios de maduración. El pH ideal de los medios es de 7.4 para lo cual se utilizó HCl para bajar el pH y NaOH para subir el pH.

### 3.4.2. Filtrado de los medios

Una vez equilibrados el pH de los medios, se procedió a la filtración de los mismos con la finalidad de evitar que tengan residuos y se encuentren libres de patógenos, con filtros de 0.8 micras y las primeras gotas se desechan al vacío y lo restante se lleva a un frasco estéril.

### 3.4.3. Acondicionamiento del medio ambiente

Las condiciones dentro el laboratorio, fueron controladas la higiene, donde todos los materiales fueron puestos en autoclave antes de cualquier uso.

La mesa de trabajo y próximos al microscopio y cámara de flujo laminar, fueron lavados con alcohol para evitar contaminación de los medios de cultivo y los mismos ovocitos.

La preparación o manejo de las herramientas durante el proceso fuera de la cámara de flujo laminar fue acompañado con un mechero para evitar la proliferación de microorganismos.

El ambiente laboral estuvo acondicionado a una temperatura constante de 37 °C. Durante todo el periodo de trabajo con estufas por combustión de gas y energía eléctrica (controlado con un termómetro medio ambiental) durante la colección de ovocitos, lavado, cultivo, y evaluación de COCs.

Se llevó a la estufa los materiales de plástico como las placas petri. Se prepararon las micropipetas de 20 y 100 microlitros juntamente con sus tips.

Se preparó el estereo microscopio a temperatura ambiente, en el caso del laboratorio de la misma forma a una temperatura de 34°C para la manipulación apropiada de los ovocitos.

Se calentó a 38° C los medios de recuperación y cultivo en la estufa con la finalidad de no producir un shock térmico a los ovocitos antes de la recuperación y la maduración.

### **3.5. PROCEDIMIENTO**

#### **3.5.1. Colección de ovarios del matadero**

Se trabajó con ovarios de vacas procedentes de diversas regiones del altiplano del departamento de La Paz, mismos que fueron faeneados en el matadero de Los Andes perteneciente y supervisado por el municipio de la ciudad de El Alto Departamento de La Paz, que reúne las condiciones técnicas básicas.

La colección de ovarios sucedió aproximadamente 15 minutos posterior al aturdimiento, desangramiento y despellejado. Dado el protocolo de evisceración, se inició con el estómago, intestinos, terminando con el recto y el ano. Fue en este momento donde se colectó los ovarios, realizando un corte transversal tres cm antes del hilio ovárico; cumpliendo la condición de que no

sufra enfriamiento y sumergiendo inmediatamente en la solución salina fisiológica (38 °C) contenidos en un termo para evitar el descenso de temperatura.

Transcurridas tres horas en promedio, el termo conteniendo los ovarios, fueron trasladados al laboratorio. Los componentes que se describen a continuación es la composición del excipiente donde se mantuvo los ovarios:

CUADRO 11  
SOLUCIÓN PARA CONSERVAR LOS OVARIOS

Cantidad	Descripción
1000 ml	Solución salina fisiológica al 0,9 %
100 UI/ml	penicilina
100 µg/ml.	estreptomicina

Fuente: Limachi, F. 2008.

### 3.5.2. Recuperación de ovocitos

Para el inicio del trabajo de colección de COCs, los ovarios fueron lavados con otra solución de salina fisiología, hasta que no emita coloración sanguinolenta.

- **Técnica de Punción Aspiración**

En una jeringa de 10 ml y con aguja de 18 gaus, se aspiró 3 ml del medio de recuperación dulbecus o M-199 + BSA atemperado a 38 °C. Con esta misma jeringa, se realizó la punción a los folículos de los ovarios, comprendidos de 3 a 8 ml de diámetro, realizando inmediatamente la aspiración de todo el contenido folicular posible. La deposición de esta solución, se realizó en conjunto, en una placa petri de 12 cm de diámetro conteniendo el mismo medio de recuperación dulbecus o M-199 + BSA atemperado a 38° C. Seguidamente se inició la búsqueda de COCs empleando micropipeta y estéreo microscopio. Todo esto dentro de la cámara de flujo laminar.

- **Técnica de slicing**

En una placa petri de 12 cm de diámetro, se depositó 5 ml de dulbecus o M-199 + BSA atemperados a 38 °C., donde se depositó los ovarios y fue seccionado con el empleo de bisturí en cortes transversales y paralelas del ovario, formando láminas con un grosor de 6 ml., estos fueron removidos y lavados con el mismo medio para que los posibles ovocitos sedimenten en el fondo de la placa y el medio, luego se separó los tejidos, quedando solamente el medio y residuos de tejidos ováricos. Secuencialmente se inició con la búsqueda de ovocitos empleando micropipeta y estéreo microscopio. Todo esto dentro de la cámara de flujo laminar.

### **3.5.3. Búsqueda de ovocitos**

Una vez aspirados los folículos, se procedió al conteo y selección de ovocitos inmaduros para ser cultivados. Este trabajo se realizó dentro la cámara de flujo laminar, que brindó calor y asepsia durante la búsqueda con la ayuda de un estéreo microscopio óptico de 40X.

Los criterios de selección de ovocitos fueron según Lorenzo. P. G. L., (1992):

- El oocito, aislado de su folículo, presenta un núcleo grande, situado periféricamente, rodeado de la membrana nuclear y con un nucleolo apenas visible. Este estado nuclear se corresponde con el estadio de dictiatio meiótico (GV).
- Los orgánulos citoplásmicos se distribuyen por todo el citoplasma de la célula y así las mitocondrias se localizan en la periferia, mientras que en posición central se encuentran gránulos corticales, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y vesículas lisosomales.
- El espacio perivitelino (EPV) no existe o es muy pequeño y la zona pelúcida se encuentra atravesada por las prolongaciones de las células

de la corona radiada, constituyéndose como uniones intercelulares ('gap junctions').

- El oocito inmaduro presenta el cúmulo celular compacto e incluso dificulta la visión del propio oocito.

Los ovocitos encontrados durante la búsqueda fueron trasladados a placas petri de 3 cm de diámetro con medio de cultivo M-199+BSA ó IVF-TL o en un volumen de 1 ml., conteniendo alrededor de 15 ovocitos.

#### **3.5.4. Cultivo de Ovocitos**

Se preparó la cámara de cultivo celular (bolsa de nylon con sierre hermético y ducto para suministración de gases) calentándolo a 38 °C, dentro la estufa de cultivo con 90% de humedad con 20 ml de agua bi destilada depositada en la caja petri descubierta. El cultivo de ovocitos se realizó en 1 ml de medio M-199+BSA ó IVF- TL, contenidas en cajas petri de 3 cm de diámetro, debidamente identificados, para lo cual se transfirió los ovocitos de la caja petri de selección con micropipetas conteniendo el medio de cultivo. Una vez transferido los ovocitos en los platos petri, se introdujo dentro la cámara de cultivo celular, que está en la estufa, y permaneció durante 24 horas.

Luego de depositar los platos petri conteniendo ovocitos, la cámara de cultivo celular se cerró herméticamente. Inmediatamente después del cierre se suministró con 90% nitrógeno atmosférico 5% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>, mediante un conducto que conectó a un tanque de gas de mezcla trinaría durante 1 minuto con una presión de 1.5 atm. La provisión de gases se realizó cada 6 horas por un tiempo de 20 segundos.

#### **3.5.5. Evaluación de capas del cúmulus oophurus de ovocitos**

La evaluación se realizó a 24 h transcurridas la incubación, al total de complejo óvulo cumulares colectados por animal, realizando el conteo de número de capas de células del cúmulos alrededor del ovocito observando la cantidad de

capas paralelas entre sí alrededor de la envoltura celular. La evaluación fue visual, empleando estereo microscopio.

Seleccionados los ovocitos, se clasificaron en tres tipos, según la morfología del cúmulus de células que lo rodean (Lorenzo. P. G., 1992):

- Oocitos tipo A. Presentan un cúmulus con más de 5 capas de células.
- Oocitos tipo B. Están rodeados tan sólo por 3-5 capas celulares.
- Oocitos tipo C. Se encuentran desnudos o parcialmente desnudos de células del cúmulus.

La maduración de cada una de oocitos se realizó de manera independiente de los otros tipos.

### **3.5.6. Fijación de ovocitos desnudos**

#### **a) Fijación**

Los ovocitos que fueron evaluados en su desarrollo de las capas del cúmulus, y que llegaron al tipo A y B, fueron separados sus capas con la ayuda de una solución con heparina y apoyo mecánico de una micropipeta, quedando las células desnudas. Esta célula desnuda, se depositó sobre un porta objeto, y alrededor suyo se armó cuatro pedestales con parafina líquida para que sujete el cubre objetos; la finalidad de este trabajo es evitar el aplastamiento de los ovocitos y mantener su estructura natural. Para asegurar la adhesión del cubre objeto, se coadyuvó con pegamento (clefa) en las cuatro aberturas del cubre objetos.

#### **b) Extracción de lípidos del ovocito**

Una vez fijado los ovocitos y desnudos, se sumergieron en ácido acético glacial y orceína por un periodo mínimo de 3 días, con la finalidad de remover el exceso de lípidos de los ovocitos a nivel nuclear, mismos hubieron dificultado la visibilidad en el microscopio. Por otra parte, la tinción tiene por propósito el

pigmentar los orgánulos celulares, de esta manera permitir la visibilidad del primer corpúsculo liberado.

### c) Evaluación nuclear

La evaluación de la maduración del ovocito, se realizó con la ayuda de un microscopio de 40X biocular, visualizando la forma del núcleo del ovocito, la estructura que presenta, y lo más importante fue la observación de la liberación del primer corpúsculo polar del núcleo hacia la zona pelúcida.

## 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 3.6.1. Estadígrafo empleado

El análisis estadístico para determinar significancia estadística del desarrollo de las capas cumulares de los ovocitos y su maduración nuclear o no a efecto de los factores, se empleó la fórmula estadística del Chi <sup>2</sup> (Sistema de Análisis Estadístico versión 9.2) y cotejado con Calzada B. (1980) e Ibañez V. (2003):

$$\chi^2 = \sum \sum \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Donde:

$\chi^2$  = Chi cuadrado

$O_{ij}$  = frecuencia calculada (sumatoria de una variables observada)

$E_{ij}$  = frecuencia esperada (sumatoria de una variable esperada)

### 3.6.2. Factores de estudio

Técnica de colección de los COCs

Medio de recuperación de COCs

Medio de maduración de los COCs.

### 3.6.3. Variables de estudio

Nº y porcentaje de Tipos de maduración de células del cumulus del ovocito (A, B y C).

Nº y porcentaje de ovocitos con maduración nuclear (vivos y muertos)

### 3.6.4. Cantidad de folículos y ovocitos

CUADRO 12  
DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DEL EXPERIMENTO SEGÚN FACTORES

	Nº de ovarios trabajados	Nº de ovocitos recuperados (aprox. 7 c/u)	Nº de ovocitos a madurar	Total ovocitos evaluados
Semana 1	21	125	86	86
Semana 2	22	105	87	87
Semana 3	23	124	84	84
Semana 4	25	122	81	81
Semana 5	26	134	77	77
Semana 6	21	118	82	82
<b>TOTAL A EVALUAR</b>		<b>728</b>	<b>497</b>	<b>497</b>

Fuente: elaboración propia

### 3.6.5. Cantidad ovocitos evaluados por semana

CUADRO 13  
OVOCITOS EVALUADOS POR REPETICIÓN SEGUN FACTORES

Técnicas de recuperación	Nº de ovocitos	Medios de recuperación	Nº de ovocitos	Medios de maduración	Nº de ovocitos
punción aspiración	48	MR 1: M-199+BSA	24	MM 1: M-199+BSA	13
				MM 2: IVF-TL	11
		MR 2: Dulbecus	23	MM 1: M-199+BSA	12
				MM 2: IVF-TL	11
slicing	35	MR 1: M-199+BSA	18	MM 1: M-199+BSA	9
				MM 2: IVF-TL	8
		MR 2: Dulbecus	17	MM 1: M-199+BSA	8
				MM 2: IVF-TL	8

Fuente: elaboración propia

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1. TIPOS DE MADURACIÓN DE CELULAS DEL CÚMULUS DEL OVOCITO

##### 4.1.1. Efecto de las técnicas de recuperación sobre los tipos de maduración de las células del cúmulus

CUADRO 14  
EFECTO DE LAS TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CELULAS DEL CÚMULUS

Técnica de recuperación	A	B	C	total
Punción Aspiración	40	119	129	288
	7.84 %	23.33 %	25.29 %	56.47 %
Slicing	39	104	79	222
	7.65 %	20.39 %	15.49 %	43.53 %
Total	79	223	208	510
	15.49 %	43.73 %	40.78 %	100.00 %

Fuente: elaboración propia

$\chi^2 = > 0,05$  n.s.

El cuadro 14, expresa los tipos de maduración de las capas de células del cúmulus a efecto de dos técnicas empleada en la recuperación de los ovocitos. Con la técnica de punción aspiración se trabajó con un total de 288 unidades de ovocitos, representando el 56,47 % del total. Con la técnica de slicing se tiene 222 ovocitos, que representa el 43,53 %, sumando un total de 510 ovocitos haciendo el 100 %.

La prueba de contingencia  $\chi^2$  a un nivel de significancia del 95 % y un margen de error del 5 %, presentó que  $\chi^2$  calculada es menor a  $\chi^2$  tabular, por lo

tanto no existe diferencias significativas entre las técnicas de recuperación (anexo 2).

Con la técnica de punción aspiración, llegaron al tipo A, B y C con 40; 119 y 129 ovocitos, representando el 7,84 %; 23,33 % y 25,29 % respectivamente. Con la técnica de slicing llegaron al tipo A, B, y C con 39; 104 y 79 ovocitos, representando el 7.65%, 20,39% y 15,49%; respectivamente (gráfica 1).

Los totales según las dos técnicas de recuperación son: tipo A; B y C con; 79, 223 y 208 ovocitos, representado 15,49 %; 43,73% y 40% respectivamente, haciendo una sumatoria del 100%.

La recolección de oocitos proviene de animales vivos (animales jóvenes, vacas productoras de leche, vacas de carne) permiten incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora/año obtenidos por procedimientos *in vitro*, y los que mejores resultados tienen es por punción aspiración con 84 % y 38 % con slicing (Rizos A. 2007), estos datos son similares a los encontrados en la presente investigación, donde slicing demanda más medio de recuperación, tiempo y genera residuos de tejidos, dificultando la identificación y búsqueda de COCs. Contrariamente se obtuvo mayor cantidad ovocitos con punción aspiración.

Similares experimentos, presentó ovocitos bovinos con 89,7% (1.308 ovocitos madurados/1.458 ovocitos colectados). La tasa de división (porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de cuatro o más células del total de ovocitos fertilizados *in vitro*) fue 82,3% para ovocitos cultivados en KSOM y 80,1% para ovocitos cultivados en medio HTF modificado (Ahuja, A. *et. al.* 2009).

En experimentos de criogenización de ovocitos realizados por Landinez, *et. al.* (2007), los ovocitos recuperados por slicing, fueron madurados y sometidos a una solución vitrificadora de etilenglicol e inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido durante al menos una semana. Cumplido este lapso, se descongelaron y se colocaron en el medio de maduración para valorar la

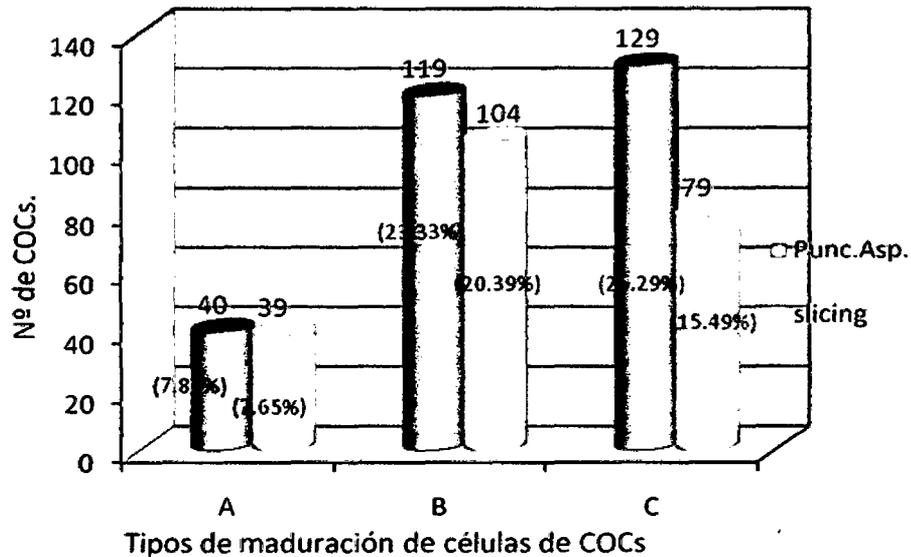
sobrevivencia morfológica. El resultado de los ovocitos descongelados en pajilla abierta fue en promedio 30 % de tipo A y 34% de tipo B; lo cual implica la gran importancia de las capas de células cumulares para su sobrevivencia.

Trabajos realizados por Fernandez, *et. al.*, (2010), recuperaron 1331 ovocitos de ovarios obtenidos en mataderos, de los cuales 670 fueron recuperados por punción aspiración y 661 por slicing, los cuales se cultivaron en medio TCM-199. De 302 ovocitos recuperados por punción aspiración, 97 maduraron y de 294 ovocitos recuperados por slicing maduraron 95 para 32.1% y 32% respectivamente no identificando si son de tipo A ó B, estos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación, en razón de que se aproxima al 40 %.

Por otra parte, trabajos realizados por Robledo V. *et. al.* (2009), indican que los complejos cúmulo-ovocitos (COC) se obtuvieron, por punción/aspiración de folículos de 2-6 mm de diámetro de ovarios de ovejas sacrificadas en rastro. Un total de 120 COC de calidad 1 y 2 fueron distribuidos aleatoriamente en dos medios de maduración resultando 96 maduros, que representa el 80 %.

Al respecto, Cabrera P. *et. al.* (2009), dice que los ovocitos se aspiraron con jeringas de 5 ml y aguja N° 20. Los ovocitos se ubicaron con un estereoscopio a 20x y se clasificaron en clase A, B, C y D, según el número de capas de células del cúmulus que cubrían al ovocito, utilizándose para la presente investigación solamente los de calidad A y B. Los porcentajes de fertilidad para toros varió de 56.8 y 72.9 %.

**GRÁFICA 1**  
**EFFECTO DE LAS TECNICAS DE RECUPERACIÓN SOBRE LOS TIPOS DE**  
**MADURACIÓN DE LAS CÚLULAS DEL CÚMULUS**



La gráfica 1, numéricamente, expresa diferencias en los resultados obtenidos, mostrándose mayor cantidad en el tipo C que comprende desde óvulos desnudos hasta con dos capas de células cumulares que representa el 40.78 %. Esta situación puede atribuirse a los diferentes estados de maduración con las cuales estos fueron colectados o que pudieron haber sufrido daños mecánicos en el momento de la obtención, es así que con el slicing se tuvo dificultades al realizar los cortes longitudinales, que facilitó el desprendimiento de porciones de tejidos ováricos que demandó mayor cantidad de medios de obtención y dificultó la mejor búsqueda estereoscópica.

Por otra parte, Gallegos A. y Mellizo E. (2006), indican que los mejores ovocitos son los que superan las tres capas de células cumulares, 43,73 % llegaron a este tipo, siendo fisiológicamente aptos para proveer nutrientes al núcleo del ovocito para que este también siga el proceso de maduración. Por otra parte, el tipo A implica 7,65% que son aquellos que sobrepasaron las cinco capas cumulares; el cual implica que tienden a expandirse llegando al estado óptimo de maduración, pero también indicando el inicio del envejecimiento celular, porque a la final la separación llegará a convertirse en ovocito desnudo.

Alrededor de la célula ovocitaria, se diferencia una capa protectora de varias decenas de micras de grosor y constituida por una mucoproteína que envuelve al ovocito, conocida como zona pelúcida. Existe además una estructura histológica constituida por células foliculares, provenientes posiblemente de la membrana granulosa, conocida comúnmente como corona radiada. Tanto la zona pelúcida como la corona radiada desempeñarán un rol importante en los procesos de penetración espermática en caso de que los ovocitos madurados fueran fertilizados (Córdova *et. al.* 2010).

El proceso de maduración folicular se adelanta a la ovogénesis, toda vez que en el folículo maduro de Graff, el ovocito se encuentra en estadio de desarrollo del ovocito secundario con el primer corpúsculo polar (Córdova *et. al.*, 2010). Este evento fisiológico es en razón de que el flujo de metabolitos tiene que ser mediante las diferentes células que conforma el folículo, mismos que comunicarán al ovocito, para su posterior maduración hasta que tenga efecto en los cambios de maduración nuclear.

#### 4.1.2. Efecto de los medios de recuperación sobre los tipos de maduración de las células del cúmulus

CUADRO 15  
EFECTO DE LOS MEDIOS DE RECUPERACIÓN SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS

Medio de Recuperación	A	B	C	total
Dulbecus	43	100	100	243
	8.43 %	19.61 %	19.61 %	47.65 %
M-199+BSA	36	123	108	267
	7.06 %	24.12 %	21.18 %	52.35 %
Total	79	223	208	510
	15.49 %	43.73 %	40.78 %	100.00 %

Fuente: elaboración propia

$X^2 = > 0,05$  n.s.

El cuadro 15, describe los diferentes tipos de maduración que tuvieron a efecto de los medios de obtención o recuperación empleada en el manejo de los ovarios. Con el medio Dulbecus se maduró con un total de 243 ovocitos, representando el 47.65 % del total. Con el medio M-199, se maduró 267

ovocitos, que representa el 42,35 %, haciendo un total de 510 unidades que representa el 100 %.

La prueba de contingencia  $\chi^2$  a un nivel de significancia del 95 % y un margen de error del 5 %, presentó que  $\chi^2$  calculada es menor a  $\chi^2$  tabular, por lo tanto no existe diferencias significativas entre los factores medios de obtención (dulbecus y M-199+BSA) de ovocitos (anexo 3).

Con el medio de recuperación Dulbecus, logró obtener los tipos A, B y C con 43; 100 y 100 ovocitos, representando el 8,43 %; 19,61 y 19,61 % respectivamente. Con el medio de recuperación M-199 + BSA se lograron madurable los tipos A, B, y C con 36; 123 y 108 ovocitos, representando el 7,06 %; 24,12 % y 21,18% respectivamente (gráfica 2).

Los totales madurados a efecto de los medios de recuperacion son: tipo A; B y C con 79; 223 y 208 ovocitos, representado 15,49 %; 43,73 % y 40 % respectivamente, haciendo una sumatoria del 100%.

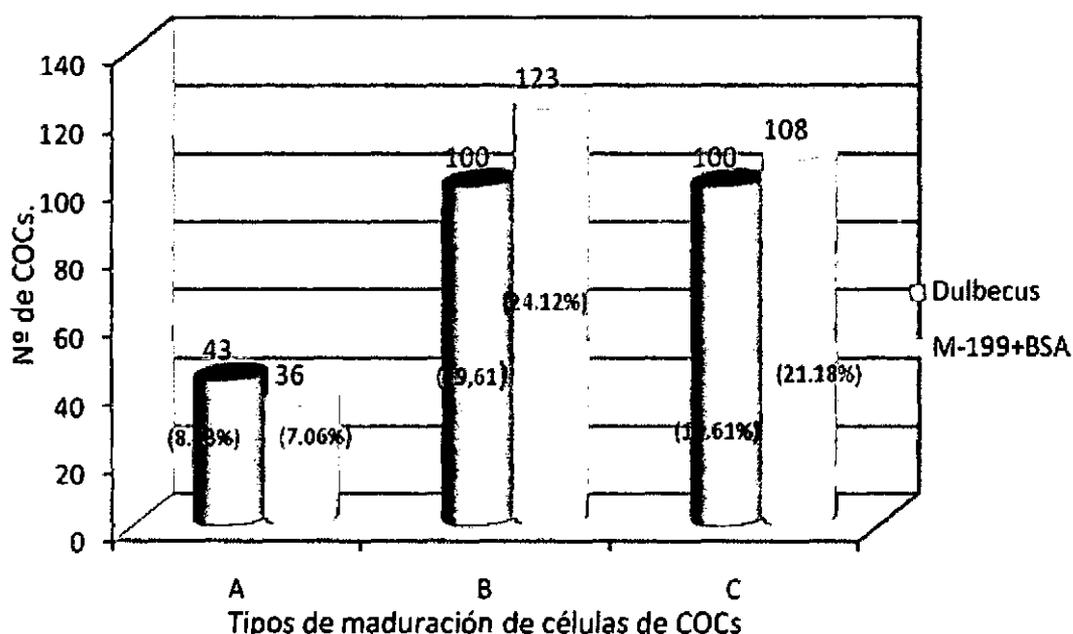
Para Lorenzo. P. G. (1992), el medio de recuperación y el lavado de los oocitos es el M-199; añadido con 1-Glutamina 20 mM, antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomycin), sales de Hepes (25 mM) De todos estos oocitos recuperados, se seleccionaron, para la maduración *in vitro* en tres grupos morfológicos (A, B y C). Para el tipo A, se obtuvo un 39,6% del total de oocitos recuperados, para el tipo B del 32,2%, y para el C, el 28,3%. Estos datos implican que el M-199 es frecuentemente empleado y se logra resultados que superan el 50 % si sumamos el tipo A B; de todo esto, se entiende que mientras más sustancias adecuadas tenga, mejores resultados se lograría, en el entendido que el líquido folicular es muy compleja.

También Romar A. (2001), empleó como medio de aspiración suero fetal bovino. Los ovocitos se clasificaron en A, B, C y D, según el número de capas de células del cúmulus que cubrían al ovocito, utilizándose para la maduración los de calidad A y B. Los porcentajes de fertilidad para toros varió de 56.8 y 72.9%, considerando estos resultados, expresa mucha eficiencia en razón de

que se muestra un producto como es un embrión *in vitro*. El alto porcentaje de la calidad B con 72 % posiblemente se deba a que en el tracto reproductivo femenino se capacita para ser fecundado y es en este tiempo donde termina su expansión cumular óptima.

El dulbecus es un medio que generalmente lo emplean varios investigadores, y analizando los resultados obtenidos, expresa que los resultados obtenidos son ligeramente inferiores al M 199 en razón de que este último tiene mayor cantidad de sustancias nutritivas, pero no deja de ser importante para en manipuleo, considerando que sus costos son bajos y accecibles en el mercado.

GRÁFICA 2  
EFECTO DE LAS MEDIOS DE RECUPERACIÓN SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CELULAS DEL CÚMULUS



La gráfica 2, expresa diferencias numéricas en los resultados logrados, mostrándose mayor cantidad en el tipo A con 43 y 36 con dulbecus y M-199+BSA respectivamente, los mismos que representan el 8.43 y 7,06 % de ovocitos con maduración eficiente del cúmulus. Seguidamente el tipo B tiene mayores proporciones, en especial con el medio M-199+BSA, este tipo implica que se lograron llegar capas desde tres hasta cinco, siendo ovocitos buenos y que representa el 43,73 % del total (19.61 +24,12 %); finalmente el tipo C con

40,79 % (19,61 + 21,18 %). Sumando las dos técnicas de recuperación que llegaron a madurar es un total de 208 COCs del total del experimento.

Es evidente que M-199+BSA es el más eficiente, en razón de que muchos de los trabajos realizados emplean este medio, más que todo en la maduración de embriones fertilizados *in vitro*. Sánchez *et. al.* (2006), indica que este medio tiene piruvato, que es una fuente energética que entrará al ciclo de krebs para que se genere síntesis de ATPs, por lo tanto energía para las células.

El folículo maduro y cercano a la ovulación está constituido por varios tipos celulares, que encierran a la célula germinal ovocítica. Así, desde el centro hacia afuera se presenta una cavidad o antro lleno de líquido folicular. En un extremo del antro, el ovocito se encuentra rodeado por una membrana muy eosinófila que él mismo elabora, la zona pellúcida y por células foliculares granulosas (epiteliales y cúbicas a cilíndricas) que constituyen la corona radiada (Sanchez y Diaz, 2006) y a partir de la corona radiata, se forma las capas cumulares, expandiéndose en gran magnitud. Todo este conjunto de células, en un cultivo *in vitro*, necesariamente demandan condiciones para multiplicarse por lo que un medio para recuperación adecuado es importante porque influye directamente en el metabolismo de todas ellas y del ovocito.

#### 4.1.3. Efecto de los medios de maduración sobre los tipos de maduración de las células del cúmulus

CUADRO 16  
EFECTO DE LOS MEDIOS DE MADURACION SOBRE LOS TIPOS DE MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS

Medio de maduración	A	B	C	total
IVF-TL	99	35	118	252
	19.41 %	6.86 %	23.14 %	49.41 %
M-199+BSA	44	124	90	258
	8.63 %	24.31 %	17.65 %	50.59 %
Total	143	159	208	510
	28.04 %	31.18 %	40.78 %	100.00 %

Fuente: elaboración propia

$X^2 = < 0,05 *$

El cuadro 16, muestra los tipos de maduración de las celular del cúmulus a efecto de los medios de maduración empleando IVF-TL y M-199+BSA. Con el medio IVF-TL se maduró un total de 252 ovocitos, representando el 49.41% del total. Con el medio M-199+BSA se maduró 258 ovocitos, que representa el 50.59%, haciendo un total de 510 ovocitos que representa el 100 %.

La prueba de contingencia  $\chi^2$ , con significancia del 95 % y un margen de error del 5 %, presentó que  $\chi^2$  calculada es mayor a  $\chi^2$  tabular, por lo tanto son diferentes significativamente entre los medios de maduración IVF-TL y M-199+BSA sobre la maduración de las células del cúmulus (anexo 4).

Con el medio de Maduración IVF-TL, se logró obtener los tipos A, B y C con 99; 35 y 118 ovocitos, representando el 19,41 %; 6,86 % y 23,14 % respectivamente. Con el medio de recuperación M-199+BSA se lograron los tipos A, B, y C con 44; 124 y 90 ovocitos, representando el 8,63 %; 24,31% y 17.65 % respectivamente.

Los totales a efecto de los medios de recuperacion son: tipo A; B y C son 143; 159 y 208 ovocitos, representado 28,04 %; 31,18 % y 40,78 % respectivamente, haciendo una sumatoria del 100% (gráfica 3).

El medio de maduración IVF – TL muestra bajos resultados, esto puede ser en razón de que este se emplea en el manejo de embriones, por lo que los nutrientes que aporta pueden ser específicos para el manejo del espermatozoide en la fertilización *in vitro*.

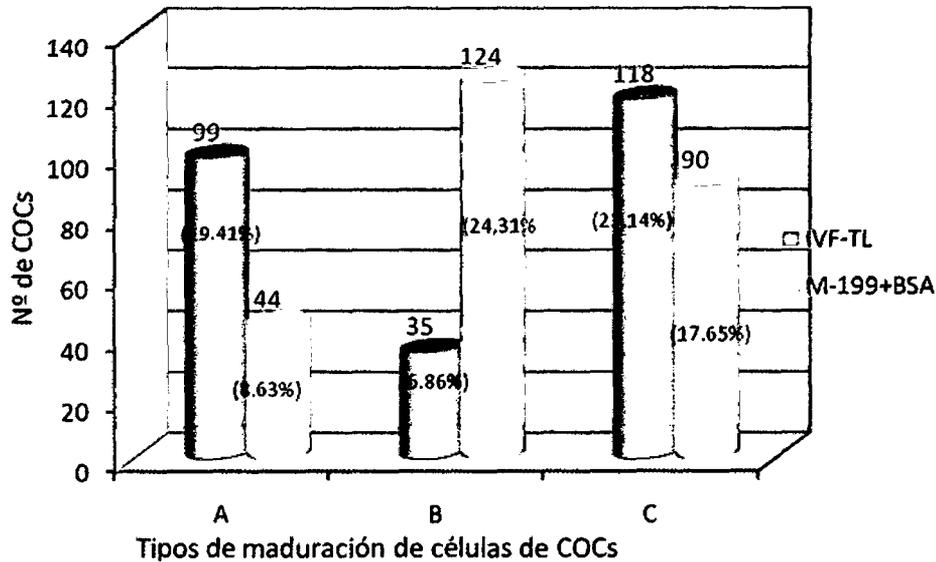
En experimentos realizados en otras especies como las gatas estimuladas con FSH y ovariectomizadas, (Sanchez A. y Silva M. 2003), recuperaron los ovarios en BSA. Los ovocitos fueron clasificados bajo un aumento de 40X como aptos (categorías I y II) y no aptos (categorías III y IV) para la MIV, basándose en las características de las células del cúmulus oophorus y corona radiada y la homogeneidad del citoplasma. Lograron obtener ovocitos catalogados como buenos  $10 \pm 5.5$  y malos  $14.8 \pm 8.4$  existiendo una relación de 40 % de aptos

para ser fertilizados. Este resultado es similar al obtenido en esta investigación en lo que concierne al tipo C.

Como consecuencia de los altos niveles de gonadotropinas liberadas antes de la ovulación, en particular de hormona luteinizante (LH), se inician una serie de acontecimientos de diferenciación que prepararán al ovocito para la fecundación y el desarrollo temprano. Estas transformaciones incluyen alteraciones específicas en la esteroidogénesis folicular, cambios en el complejo células del cúmulus oophorus-ovocito, reversión del efecto del inhibidor meiótico intrafolicular y reanudación de la meiosis. El ovocito evolucionará hasta metafase II, estadio en el que es ovulado, produciéndose la segunda reanudación de la meiosis mediante la activación desencadenada por el espermatozoide (Romar, A. 2001).

López A. *et. al.* (2007), encontró las siguientes categorías: Buenos: Cúmulus completo, con varias capas de células y citoplasma homogéneo. Regulares: Cúmulus parcialmente completo, con al menos un 50% de la superficie del ovocito cubierta con células del cúmulus y citoplasma homogéneo Malos: Ovocito con menos del 50% de la superficie cubierta con cúmulus, citoplasma no homogéneo. Comparando con otros autores, aun no existe un nomenclatura estándar para caracterizar en desarrollo de los capas cumulares, pero existe un común denominador, donde describen que a mayor desarrollo de las capas, tiene mejor maduración el ovocito. Los ovocitos con el complejo cúmulus ooforus intacto se desarrollaron en mayor porcentaje que todos los otros grupos, esto induce a pensar que la continuidad del cúmulus alrededor del ovocito es importante para llevar a cabo una maduración y fecundación exitosa.

**GRÁFICA 3**  
**EFFECTO DE LOS MEDIOS DE MADURACION SOBRE LOS TIPOS DE**  
**MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS**



Según la gráfica 3, muestra los valores en los resultados logrados, mostrándose mayor cantidad en el tipo A con 99 y 44 ovocitos cultivados con IVF-TL y M-199+BSA respectivamente, mismos que representa el 28,04 % de ovocitos con maduración eficiente. Seguidamente el tipo B con el medio M-199+BSA, logró llegar hasta capas desde tres hasta cinco, siendo las mejores ovocitos con maduración plena del cúmulus y que representa el 31,18 % del total, pero con menores resultados los madurados con IVF-TL con un 6,86 %. Finalmente el tipo C, sumando los dos medios de maduración presenta un 40,7 %; por lo tanto, los que no llegaron a madurar es un total de 31,17 %.

El evidente que el M-199+BSA tiene valores elevados con el tipo C y son los que no llegaron a tener maduración. Los bajos resultados del IVF-TL probablemente se deba a que requiere diferente tiempo, por eso es que se presenta mayor cantidad en el tipo C, porque presenta menos 4 capas cumulares.

El M-199+BSA es el más eficiente en la proliferación de las células del cúmulus, en razón de que muchos de los trabajos realizados emplean este medio, más que todo en la maduración de embriones fertilizados *in vitro*. Este

probablemente actuó sobre las células del cúmulus adheridas al ovocito secretan ácido hialurónico que resulta en la extensiva mucificación de las células del complejo cúmulus ooforus, dispersándolas. Esta expansión de las células del cúmulus produce la ruptura de las "Gap Junctions". Estos cambios se cree que son causados por las gonadotropinas y mediados por AMP cíclico (Lopez A. *et. al.*, 2007).

## 4.2. MADURACION NUCLEAR DE OVOCITOS

### 4.2.1. Efecto de las técnicas de recuperación sobre la maduración nuclear de ovocitos

CUADRO 17  
EFECTO DE LAS TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN SOBRE LA  
MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS

Técnica de recuperación	Sin maduración nuclear	Con maduración nuclear	total
Punción aspiración	113	172	285
	22.74 %	34.61 %	57.34 %
slicing	67	145	212
	13.48 %	29.18 %	42.66 %
total	180	317	497
	36.22 %	63.78 %	100 %

Fuente: elaboración propia.

$\chi^2: > 0.05$  n.s.

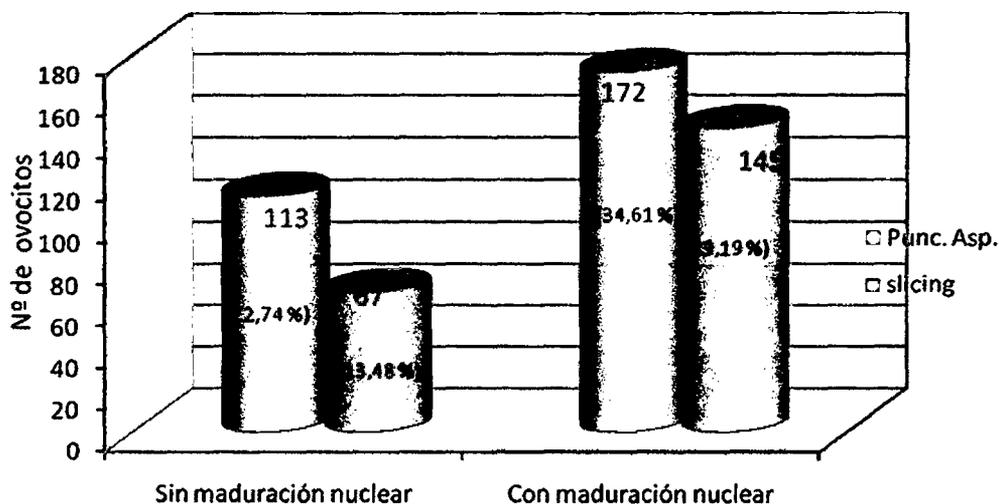
El cuadro 17, muestra las cantidades y porcentajes de ovocitos que lograron la maduración nuclear o que llegaron a metafase II, a efecto de las técnicas de recuperación de COCs punción aspiración y slicing. Con la técnica de punción aspiración se trabajó un total de 285 ovocitos, representando el 57.34%, de los cuales 113 no llegaron a metafase II (22.74 %) y 172 sí (34.61 %). Con la técnica de slicing se trabajó con 212 ovocitos, que representa 42.66 %, de estos 67 (13.48 %) no llegaron a metafase II y 145 ovocitos llegaron a metafase II (29.18%).

La prueba de contingencia  $\chi^2$  a un nivel de significancia del 95 % y un margen de error del 5 %, presentó que  $\chi^2$  calculada es menor a  $\chi^2$  tabular, por lo tanto no presentando diferencias significativas entre los factores las técnicas de obtención (anexo 5).

Los totales a efecto de los técnica de recuperación son 180 sin maduración y 317 con maduración nuclear con 36.22 % y 63,78 % respectivamente, haciendo un total de 497 ovocitos trababados y representando el 100% (gráfica 4).

Fernandez, *et. al.*, (2010), recuperaron 1331 ovocitos de ovarios obtenidos en mataderos, de estos 670 fueron recuperados por punción aspiración y 661 por slicing, los cuales se cultivaron en medio TCM-199. La maduración fue evaluada por la técnica de fijación y tinción con orceína acética. De 302 ovocitos fijados a partir del método de punción aspiración, 97 maduraron y de 294 ovocitos fijados a partir del método de slicing maduraron 95 para 32.1% y 32% respectivamente. Estos valores son inferiores al presente trabajo, posiblemente debido a otros factores que no son considerados como ser la composición de los gases, la concentración de los medios de maduración etc.

GRÁFICA 4  
EFECTO DE LAS TECNICAS DE RECUPERACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS



De los Reyes M. *et. al.* (1999), colectaron ovocitos de los foliculos antrales de 2 a 6 mm de diametro por puncion aspiración, logrando obtener 75,3 % de ovocitos que llegaron al estado de metafase II y las células del cúmulus, tuvieron los valores más bajos de maduración con 34,9 % y 31 %. Los resultados de este autor, son similares a los obtenidos en la presente investigación por la técnica empleada.

La recuperación del complejo cúmulus-ovocito (COC) por corte del ovario es una técnica sencilla (slicing) y más eficiente que los métodos de aspiración y perforación. Los folículos mayores de 3 mm tienen más capas de cúmulus y presentan una mejor maduración *in vitro*, circunstancias a tener en cuenta para seleccionar ovocitos al final de su fase de crecimiento (Córdova I., *et. al.* 2008).

En experimentos de criogenización de ovocitos realizados por Landinez, *et. al.* (2007), los ovocitos recuperados por slicing, por un citoplasma homogéneo y al menos una capa completa de células del cúmulus compacta. Una vez madurados, los COCs que presentaron citoplasma homogéneo y al menos una capa completa de células de los cúmulus, fueron sometidos a una solución vitrificadora etilenglicol y criogenizados en nitrógeno líquido. Se descongelaron y se colocaron en el medio de maduración para valorar la sobrevivencia morfológica. En el resultado, los ovocitos descongelados en pajilla abierta fue en promedio 63,15 % de óvulos maduros. Pese a que la criogenización demanda mayor riesgo en la sobrevivencia, los resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo.

En la evaluación morfológica del ovocito posterior al cultivo *in vitro* en el día 1 se observó cuerpos polares, eje polar y características del citoplasma. Observación detallada de pronúcleos y distribución de cuerpos precursores nucleolares (Elder, 2008), eventos de cambios morfológicos que son indicadores de la maduración nuclear y ser aptos para ser fecundados.

Cuando se ovula el ovocito I con su corona radiada, éste termina su primer meiosis y en la citocinesis se separará una célula con todo el citoplasma, el ovocito II y otra con citoplasma sumamente escaso, el 1º cuerpo polar (CP). El 1º CP se ubica entre el ovocito II y la zona pelúcida, en un espacio virtual denominado periovocítico o perivitelino (Sanchez y Diaz, 2006), estos son los cambios morfológicos que sufre el ovocito, y los que llegaron a madurar son los que llegaron a sufrir la extrusión del primer corpúsculo polar, y seguramente cumpliendo los fenómenos que suceden *in vivo*, que es la fase de reclutamiento, en este caso la selección y por el efecto de los factores del experimento, 172 y 145 ovocitos llegaron a la fase de dominancia.

La diferencia numérica entre las técnicas punción aspiración y slicing, se atribuiría a que con slicing sufrió daños mecánicos al núcleo del ovocito, repercutiendo en una menor recuperación de células. Además que con los cortes realizados, liberó fragmentos de tejidos que dificultaron la visibilidad al momento de seleccionar. Considerando que existe una intercomunicación para que se desarrolle las capas de las células controladas por la síntesis de RNA e transmisión de nutrientes por parte de las células del cúmulus.

Durante largos periodos que van desde la formación del ovocito primario hasta la ovulación, los cromosomas permanecen condensados en el núcleo, estas células que miden de 10 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, siguen creciendo y acumulando gran cantidad de citoplasma, llegando en su madurez a medir alrededor de 80  $\mu\text{m}$ . Una vez que el ovocito ha completado su desarrollo, el folículo que lo contiene sigue creciendo, de forma que llega a medir de 15 a 20 mm en el momento previo a la ovulación (Bustamante B. A., 2008).

Durante la ovulación, el oocito secundario, rodeado de una serie de células, surge del folículo en el momento de su ruptura, entrando a las trompas de Falopio. Solamente si es fecundado en estas por un espermatozoide ocurrirá el último paso de la maduración del oocito secundario, con la extrusión del 2º corpúsculo polar y formación del óvulo maduro, que lógicamente es una célula haploide como resultado de las dos divisiones nucleares con solamente una replicación de los cromosomas (Bustamante B. A., 2008); este fenómeno fisiológico, tiene control hormonal, en razón de que la FSH y la LH son los responsables de que concluyan el desarrollo, secretados por las células de la granulosa, y que serán comunicados mediante las células cumulares atravesando la corona radiata y la zona pelúcida hasta llegar al núcleo celular, generándose una comunicación paracrina (Illera M. 1994).

#### 4.2.2. Efecto de los medios de recuperación sobre la maduración nuclear de ovocitos

CUADRO 18  
EFECTO DE LOS MEDIOS DE RECUPERACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS

Medios de recuperación	Sin maduración nuclear	Con maduración nuclear	total
Dulbecus	87	155	242
	17.51 %	31.19 %	48.69 %
M-199+BSA	93	162	255
	18.71 %	32.60 %	51.31 %
total	180	317	497
	36.22 %	63.78 %	100 %

Fuente: elaboración propia.

$\chi^2$ : > 0.05 n.s.

Los datos que presenta el cuadro 18, muestra las cantidades y porcentajes de ovocitos que lograron la maduración nuclear o llegar a la metafase II, a la efecto de los medios de recuperación de COCs dulbeccus y M-199+BSA. Con el medio dulbeccus se trabajó un total de 242 ovocitos, representando el 48.69%, de los cuales 87 no llegaron a metafase II (17.51 %) y 155 sí maduraron (31.19 %). Con la técnica de M-199+BSA se trabajó con 255 ovocitos, que representa 51.31 %, de estos 93 (18.71 %) no llegaron a metafase II y 162 ovocitos llegaron a metafase II (32.60%).

Mediante la prueba de contingencia  $\chi^2$  a un nivel de significancia del 95 % y un margen de error del 5 %, presentó que  $\chi^2$  calculada es menor a  $\chi^2$  tabular, por lo tanto no presentando diferencias significativas entre los factores medios de recuperación (anexo 6).

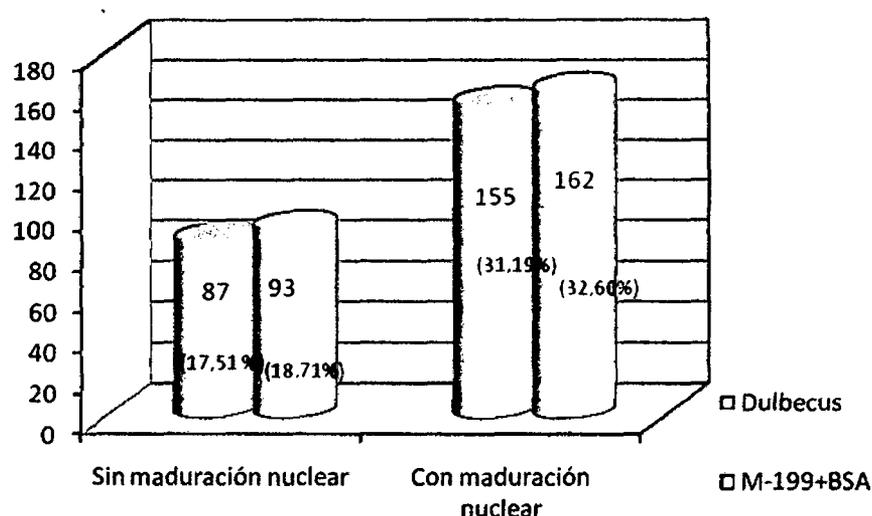
Los totales a efecto de los medios de recuperación son 180 sin maduración y 317 con maduración nuclear con 36.22 % y 63,78 % respectivamente, haciendo un total del 100% (gráfica 5).

Ruiz J., *et al.* (2007), reporta que no se empleó medio de recuperación, y solo se aspiró el líquido folicular con los COCs recuperados se depositó en medio oviductal sintético modificado, suplementado con 25 mM HEPES y 1 mg/ml de albúmina sérica bovina. Los COCs seleccionados bajo una lupa estereoscópica

fueron madurados *in vitro* por 20-22 horas en estufa de cultivo con atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> al aire a 38,5 °C en gotas de 50 µl (8-12 COCs/ gota) de medio de cultivo de tejidos (TCM-199) con 25 mM de Hepes suplementado con piruvato de Na 0,2 mM, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, FSH 0,02 unidades/ml, estradiol 17-β 1 µg/ml y suero fetal bovino al 10% (v/v). Desde el punto de vista morfológico, se logró 55,1% de supervivencia. Estos resultados son inferiores a los resultados de este trabajo, posiblemente debido a la poca cantidad de líquido folicular, que no pudo retener una temperatura constante o no facilitó la oxigenación celular.

De los Reyes M. *et. al.* (1999), realizó la recuperación con suaves pipeteos 3 a 6 conteniendo medio de TCM 199, y suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado, 0,2 mM de piruvato de sodio, 5 mg/ml (0,005 U/ml) de FAH-P y 1 mg/ml de gentamicina.; logrando obtener 75,3 % de ovocitos que llegaron al estado de metafase II y las células del cúmulus, tuvieron los valores más bajos de maduración con 34,9 % y 31 %. El TCM 199, es mayormente empleado para maduración y no en recuperación, pero probablemente se deba a otro factor no estudiando los bajos resultados logrados por el autor.

GRÁFICA 5  
EFECTO DE LOS MEDIOS DE RECUPERACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS



Actualmente, los obstáculos se considera resuelto gracias a las sucesivas modificaciones y mejoras de los medios empleados para la maduración *in vitro*

(MIV) tales como la eliminación del suero fetal bovino, la suplementación con fluido folicular porcino y cisteína, así como el ajuste de los suplementos hormonales durante la MIV (Romar A. 2001). Aun se sigue buscando mejorar estos medios para seguir incrementando resultados, de esta manera realizar fertilizaciones *in vitro*, posterior maduración y transferencia de embriones.

Algunos factores secretados por las células del cúmulus, tales como glicosaminoglicanos y hormonas esteroideas, intervienen en la maduración citoplasmática. La expansión del cúmulus es necesaria para la fertilización y desarrollo embrionario temprano. La elección del medio de cultivo para la PIV de embriones bovinos depende de su eficiencia en la producción de blastocistos y de la competencia para el desarrollo que éstos muestren (Ahuja A. 2009), por lo tanto M-199 y Dulbecus aportaron de igual manera en nutrientes para que exista maduración nuclear.

#### 4.2.3. Efecto de los medios de maduración sobre la maduración nuclear de ovocitos

CUADRO 19  
EFECTO DE LOS MEDIOS DE MADURACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS

Medios de maduración	Sin maduración nuclear	Con maduración nuclear	total
IVF-TL	105	137	242
	21,13 %	27,57 %	48,69 %
M-199 + BSA	75	180	255
	15,09 %	36,22 %	51,31 %
total	180	317	497
	36.22 %	63,78 %	100 %

Fuente: elaboración propia

$X^2: < 0.05 *$

Los valores que presenta el cuadro 19, son las cantidades y porcentajes de ovocitos que lograron o no la maduración nuclear (metafase II), a la efecto de los medios de maduración IVF-TL y M-199+BSA. Con el medio de maduración IVF-TL se trabajó un total de 242 ovocitos, representando el 48.69 %, de los cuales 105 no llegaron a metafase II (21.13 %) y 137 sí llegaron a la madurez nuclear (27.57 %). Con el medio M-199+BSA se trabajó con 255 ovocitos, que

representa 51.31 %, de estos 75 (15,09 %) no llegaron a metafase II y 180 ovocitos llegaron a metafase II (36.22 %).

Mediante la prueba de contingencia  $\chi^2$  a un nivel de significancia del 95 % y un margen de error del 5 %, presentó que  $\chi^2$  calculada es mayor a  $\chi^2$  tabular, por lo tanto presentando diferencias significativas entre los factores medios de maduración (anexo 7).

Los totales a efecto de los medios de maduración son 180 sin maduración y 317 con maduración nuclear con 36.22 % y 63,78 % respectivamente, haciendo un total del 100% (gráfica 6).

Trabajos realizados por Fernandez, A. *et. al.* (1997), experimentó con un total de 748 ovocitos que fueron aspirados de folículos de diferentes diámetros de ovarios de vacas y novillas cebú postmortem. De los 748 ovocitos, 344 estaban rodeados de las células del cúmulus y 404 ovocitos no presentaban células del cúmulus (desnudos). Se maduraron en TCM-199 suplementado con estradiol, suero fetal bovino y gonadotropina coriónica humana equilibrado en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub> y 90 % de N<sub>2</sub>. Un total de 360 ovocitos se maduraron en el medio suplementado con 0.8 µg/mL de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y 388 ovocitos se maduraron en su ausencia. Los maduros se fertilizaron, logrando de 70 % de embriones (522/748) estos resultados altos en comparación al presente trabajo, probablemente se deba a que las hormonas GnRH que se adicionó coadyuve en una mejor respuesta, considerando que *in vivo*, existe hormonas a nivel del antro folicular, como lo es los estrógenos, ó puede ser por la presencia de suero fetal bovino, por contener sustancias hormonales placentarias, que son los que posiblemente aporten en una buena nutrición del ovocito.

Ovocitos frescos desnudos de conejo realizados por Vallejo J. *et. al.* (2003), sometieron a una serie de 2 pulsos eléctricos (CC; 1,5 kV/cm; 200 (s) separados por un segundo, y cultivados posteriormente en citocalasina B mostraron unos porcentajes de activación del 77% y de desarrollo hasta

blastocisto del 25%. Este es un trabajo partenogénico que es muy importante considerar, en razón de que resultaría muy económico.

El medio de maduración fue el TCM-199 suplementado con 275 mg/L de piruvato sódico, 50 mg/L de gentamicina, 146 mg/L de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino. Los complejos cúmulus-ovocito fueron cultivados en grupos de 10, en microgotas de 50  $\mu$ L de medio cubiertas con aceite mineral, durante 27 horas a 38,5°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad. Se logró ovocitos con 52,75 % en MII y 47 % inmaduros, con y sin células del cúmulus. Estos elevados resultados de maduración nuclear, probablemente se deba al medio de maduración empleado, porque muchos científicos del área emplean el mismo, o posiblemente sea a efecto de algunos de los complementos como ser piruvato, etc.

Bajo condiciones *in vitro* la maduración nuclear y citoplasmática se ha realizado con distintos protocolos en los ovocitos porcinos. Entre los medios empleados son el TCM-199, TLP o el NCSU; siendo este último el de elección por sus buenos resultados en el posterior desarrollo embrionario. El periodo de MIV de los ovocitos porcinos oscila entre un mínimo de 36 horas y un máximo de 48 o incluso 50 horas. El cultivo se realiza a 38,5°C en una atmósfera saturada de humedad y un 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Generalmente el suplemento hormonal es a base de PMSG, HCG y estradiol que actualmente se mantienen sólo durante las primeras 20-22 horas de cultivo. Podemos afirmar que con las técnicas actuales, la MIV, al menos a nivel nuclear, ha alcanzado resultados prácticamente igual de efectivos que la maduración *in vivo* (Romar, A. 2001).

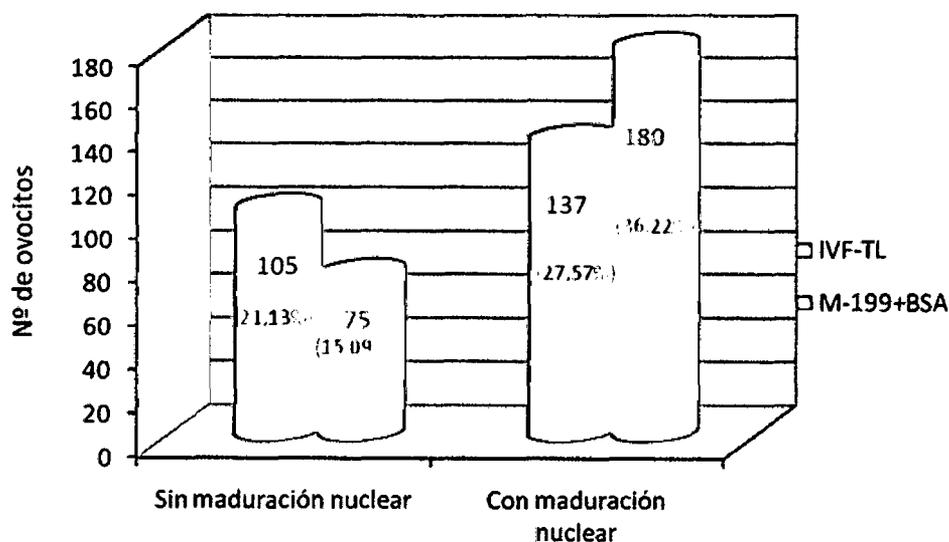
Al respecto, Cabrera, P. *et. al.* (2009), dice que los ovocitos se aspiraron con jeringas de 5 ml y aguja N° 20, y se colocaron en placas petri de 100 mm. Se utilizó el medio de aspiración suero fetal bovino. Los ovocitos se ubicaron con un estereoscopio a 20x y se clasificaron en clase A, B, C y D, según el número de capas de células del cúmulus que cubrían al ovocito, utilizándose para la presente investigación solamente los de calidad A y B. Los ovocitos fueron llevados a la cabina de flujo laminar, y colocados en gotas de 200  $\mu$ l con medio

de maduración IVM en placas de 60 mm, Los porcentajes de fertilidad para toros varió de 56.8 y 72.9%

La zona pelúcida (ZP) es una cubierta extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos de mamíferos, apareciendo durante el crecimiento de los mismos e incrementando su grosor conforme éstos aumentan su diámetro. La aparición del material de la ZP en el espacio perivitelino está correlacionada con el inicio del crecimiento del ovocito. Aquellos que no están creciendo no tienen ZP ya que los componentes proteicos de la ZP son sintetizados y secretados por el ovocito en crecimiento (Romar, A. 2001).

Cuando se produce el pico de LH se genera una disminución de la cantidad de AMPc que llega al ovocito desde las células del cumulus, debido a una pérdida de conexiones célula-célula. La disminución de la concentración ovocitaria de AMPc, junto con la translocación de la PKA (A kinase anchoring proteins), de su lugar de acción, inhibe la actividad catalítica de PKA. A consecuencia, se produce la activación de la fosfatasa Cdc25 mediante fosforilación. Esta fosfatasa provocará la activación del MPF que dará lugar a la reanudación de la meiosis y la progresión hasta MII (Bustamante, 2008).

GRÁFICA 6  
EFECTO DE LOS MEDIOS DE MADURACIÓN SOBRE LA MADURACIÓN NUCLEAR DE OVOCITOS



Los ovocitos se maduraron *in vitro* en placas de cuatro posillos por 24 horas en grupos de 25 por posillo con 500 µl de medio de maduración, el cual consistió en medio 199 (Sigma) suplementado al 10% con suero de ternero (ST) más 50 µg/ml de Gentamicina, 22 mg/ml de Piruvato 0,2 Mm, 40 mg/ml de FSH, 5 µg/ml de LH y 1ug/ml de Estradiol 17X (Frei, 2004). Obteniéndose 54 % con maduración nuclear, siendo inferior a los resultados de esta investigación. Pese a ser empleado el mismo medio 199, la participación del BSA parece ser determinante en la mayor cantidad de ovocitos maduros. La adición de albúmina sérica a los medios de cultivo ayuda al desarrollo preimplantacional debido a sus propiedades protectoras contra componentes tóxicos en el medio, aportando, además, la suplementación tradicional de proteínas (De los Reyes S. 2003).

A 23 horas de cultivo, la tasa de maduración ovocitaria alcanzó un 59,71%, valor que se elevó hasta un 83% a las 26 horas de cultivo, disminuyendo luego a un 56,25% a las 27 h. La proporción de ovocitos degenerados tras el cultivo *in vitro* también se incrementó con el aumento en la duración de la maduración ovocitaria, de un 0% a las 23 horas hasta un 10,41% a las 27 horas (Landínez *et. al.* 2010). Pese a que el tiempo no fue un factor a probar, existe una constancia de emplear 24 horas de maduración, pero parece ser variable, porque algunos autores manejan diferentes tiempos como ser 22 hasta 27 horas, el cual amerita realizar otras evaluaciones.

Tur, R. *et. al.* (2007), maduraron *in vitro* ovocitos humanos, logrando el 62.3% de ovocitos maduros y se transfirieron  $2.0 \pm 0.7$  embriones, consiguiéndose 4 embarazos (14.6% por punción, 17,4% por transferencia), con una tasa de implantación del 8,3%. Por otra parte en rumiantes, el fluido oviductal sintético (SOF), basado en el análisis del fluido oviductal de oveja, es usado comúnmente como medio para el cultivo de embriones, mostrando ser eficaz para el cultivo de embriones bovinos (Romar, A. 2001).

Cuando la maduración ovocitaria tuvo una duración de 24 horas o menos, la proporción de ovocitos que fueron clasificados como maduros fue de 59,49% y la de ovocitos degenerados de un 2,53%. En el grupo experimental en el que la

duración de la MIV fue mayor a 24 h, la proporción de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II + corpúsculo polar (MII+CP) fue de 72% y la tasa de degeneración de un 5,09% (Landínez *et. al.* 2010). Estos datos son óptimos a los de la presente investigación, pero cabe considerar que en la generalidad de los experimentos se seleccionan del total y casi un 50 son destinados a maduración cuando son colectados del ovario, lo que no sucedió en este trabajo. Posiblemente los que no llegaron a madurar requerían más tiempo.

El desarrollo del oocito está influenciado por el Inhibidor de la meiosis del oocito (OMI), es un péptido inhibidor de la meiosis del oocito que se sintetiza en la granulosa del folículo primordial y en desarrollo. Su función consiste en mantener el oocito en la etapa de diacinesis de la primera meiosis, ya que este proceso continúa su desarrollo pocas horas antes de la ovulación, por lo que se supone que la acción inhibidora del OMI se suprime con la oleada prevoulatoria de LH. No obstante, no se conoce si el pico preovulatorio de LH es capaz de inhibir la producción de OMI o si se trata de un bloqueo de las células del cúmulus oophorus al propio oocito (Illera, M. 1994).

En la evaluación de la morfología del ovocito en el día 0, incluyendo tamaño, características del citoplasma, espacio perivitelino y cuerpo polar, así como la apariencia de cúmulos y células de granulosa en el folículo, en el día 1 se observó cuerpos polares, eje polar y características del citoplasma. Observación detallada de pronúcleos y distribución de cuerpos precursores nucleolares (Elder, 2008).

La adquisición de la capacidad de desarrollo por parte de los ovocitos madurados *in vitro* es un factor limitante para que se puedan alcanzar con éxito las fases de fecundación, división y desarrollo embrionario. Esta diferenciación es orquestada por la interacción entre factores de crecimiento y citoquinas que permiten la maduración nuclear y citoplasmática (Landínez J. *et. al.* 2010).

La maduración *in vitro* de ovocitos bovinos es afectada por muchos factores, como el tiempo y la temperatura de transporte desde el matadero hasta el laboratorio, el tamaño del folículo, la etapa de desarrollo del ovocito, el

diámetro del ovocito, la composición del medio, el tiempo de maduración, las hormonas y los sueros. Un tiempo inapropiado de maduración puede permitir la formación anormal de la cromatina, el envejecimiento del ovocito y un desarrollo comprometido del mismo (Landínez J. *et. al.* 2010).

Durante la maduración *in vitro*, la extrusión del primer corpúsculo polar indica el éxito de la maduración, alcanzando el estadio de metafase II, que ocurre durante las 18-24 horas después de comenzar la maduración. Existe la evidencia de que algunos ovocitos maduran rápidamente, observándose el primer corpúsculo polar a las 16 horas. Sin embargo, un período de cultivo es necesario antes de la fecundación, para que se pueda alcanzar la capacidad de desarrollo del ovocito. *In vivo*, los ovocitos bovinos alcanzan la maduración final en el periodo entre el pico de LH y la ovulación, aproximadamente 30 h después del pico de LH. Sin embargo, la maduración nuclear del ovocito (desarrollo a metafase II) pareciera acelerarse *in vitro*: 24h son suficientes para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos obtenidos de folículos antrales (Landínez, *et. al.* 2010).

La proporción de ovocitos en metafase II aumenta significativamente ( $P < 0,05$ ) con el incremento en el tiempo de cultivo, no así la tasa de degeneración (Landínez, *et. al.* 2010), por lo que los ovocitos que no llegaron a madurar, en este experimento posiblemente requerían más o menor tiempo, en función al tamaño del folículo de los cuales fueron recogidos, probablemente los de menor tamaño requerían más y los folículos grandes menos tiempo.

La meiosis se detiene al alcanzar el estadio de diplotene difuso de la profase I, en lo que se conoce como primera detención de la meiosis. Esta detención o arresto meiótico es mantenida por un sistema múltiple de control en el que están implicados el AMPc y otros factores. En este estadio los ovocitos están rodeados por una capa de células epiteliales (foliculares) lisas no proliferativas que reciben el nombre de células pregranulosas y que ejercen un efecto inhibitorio sobre la meiosis y el crecimiento del folículo (Romar, A. 2001).

## **CONCLUSIONES**

**1.-** Las técnicas de recuperación punción aspiración y slicing de los COCs, fueron similares en el desarrollo de las capas cumulares, con una ligera diferencia numérica para la primera. Asimismo, los medios de recuperación Dulbecus y M-199+BSA tienen el mismo comportamiento sobre la cantidad de capas de COCs. Y entre los medios de maduración M-199 + BSA e IVF-TL, el primero fue superior estadísticamente en la maduración de las capas de COCs llegando a los tipos A y B.

**2.-** Las técnicas de colección de COCs, no presentaron diferencias estadísticas sobre la respuesta de la maduración nuclear de los ovocitos. Con la técnica de Punción-Aspiración se logra mayor número de ovocitos en metafase II a comparación del slicing. Por otra parte, el efecto de los medios de recuperación Dulbecus y M-199+BSA, tienen similar comportamiento sobre la maduración de ovocitos Y el mejor medio estadísticamente para la maduración nuclear hasta la llegada a metafase II, es el M-199+BSA.

## RECOMENDACIONES

- Trabajar con otras dosis el M-199+BSA para determinar la más apropiada concentración para la maduración de los COCs.
- Realizar pruebas de sobrevivencia posterior a la criogenización de ovocitos como de embriones producidos mediante el empleo de M-199-BSA.
- Realizar la transferencia de embriones madurados *in vitro*.
- Evaluar las crías nacidas producto de la transferencia de embriones cultivado *in vitro*.
- Realizar trabajos con ovarios de vacas gestantes que fueron faenadas.

## BIBLIOGRAFIA

Ahuja, A. C. Montiel, P. Pérez, H. F. y Gallegos, S. J. (2009). Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. Revista Zootecnia Trop., 27(3): 277-284. 2009. México.

Alvarracín, J. (2005). Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in vitro*. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Barcelona Facultad de Veterinaria. Bellaterra España.

Aller, J. (1992). Aplicación de la producción *in vitro* de embriones en producción animal. Biotecnología de la Reproducción del INTA Balcarce. Cryopreservation is reviewed because of its wide perspectives. (Rev Biomed 2001; 12:196-206).

Bó, G. A., P. S. Baruselli, y Chesta, P. (2006). Dinámica folicular, momento de la ovulación e inseminación artificial a tiempo fijo en donantes de embriones. Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos - IRAC- 2006. Argentina.

Bustamante, B. A. (2008). Estudio molecular y de apoptosis en ovocitos de cabras prepúberes y su relación con el desarrollo embrionario. Tesis doctoral. Unidad de Producción Animal del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona España.

Calzada, B. J. (1980). Métodos estadísticos para la Investigación Universidad Nacional Agraria la MOLINA. Lima Perú.

Cruz, Z. A. (2006). Principales factores que afectan la prolificidad del ganado vacuno en Latinoamérica. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Técnica de Cotopaxi. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ISSN 1695-7504  
Email: [aczambrano2004@yahoo.com](mailto:aczambrano2004@yahoo.com)  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Córdova, I. A., Salceter, O. J. A., Ruiz, L. G., Xolalpa, C. V., Cortés, S. S., Peña, B. S., Córdova, J. C., Méndez, M. M., Huerta, C. R., Juárez, M. M. y Guerra, L. J. (2010). Estrés oxidativo en gametos. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Volumen 11 Número 07.

Cabrera, P. V., Yoong, W. K. y Gamarra, G. L. (2009). Evaluación de la fertilidad *in vitro* del semen de toros jóvenes en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados. Rev. Inv. Vet. Perú 2009; 20 (1): 28-32

Córdova, I. A., Córdova, M. S., Córdova, J. C. A., y Guerra, L. J. E. (2008). Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. Departamento de Producción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco, e-mail: aci57@prodigy.net.mx. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, México. Rev. vet. 19: 1, 67–79, 2008.

Calderón R. N. (2005). Evaluación de la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos congelados por el método Open Pulled Straw. Facultad de Recursos Naturales Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco, Chile.

De los Reyes, M., Aguayo, J. P., Del Campo, H., y Barros, C. (1999). Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. Universidad de Chile, Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. Universidad Austral de Chile. Pontificia Universidad de Católica de Chile. Vol. 14 N° 1 y N° 2, 1999.

De los Reyes, S. M., Stuardo, R. J. A. y Barros, R. C. (2003). Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario bovino *in vitro*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México. Número 4 Octubre-Diciembre 2003.

Elder Kay (2008). REPRODUCCIÓN HUMANA. Bourn Hall Clinic, Cambridge, Reino Unido.

Fernández, R. F., Hernández, P. J. E. y Reyes, F. M. (2010). Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. Laboratorio de Manejo de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, D.F. Sitio Argentino de Producción Animal. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Fernández, R. F., Hernández, P. J. E. y Cruz P. A. I. (2007). Maduración *in vitro* de ovocitos de ovino usando concentraciones de FSH+LH y FSH en medio de cultivo. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D.F. Revista de Salud Animal. Versión *impresa* ISSN 0253-570X.

Frei, O. M. A. (2004). Desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos fecundados con espermatozoides adheridos al cúmulus. Tesis de grado. Universidad Católica de Temuco. Facultad de acuicultura y ciencias veterinarias, Escuela de medicina veterinaria. Temuco, Chile.

Figuroa, V. C., Meda, G. F. y Janacua, V. H. (2008). Manual de Buenas Prácticas de Producción en la Engorda de Ganado Bovino en Confinamiento. 2a edición. SENASICA México. [hjanacua@cascabel.ciad.mx](mailto:hjanacua@cascabel.ciad.mx).

González, E., Navarrete, L., Tamayo, A., Domínguez, A, Sanginés, J. y Ugalde, J. (2007). Influencia de la suplementación en la dieta con levaduras y minerales sobre la producción de ovocitos de ovejas púberes estimuladas ováricamente. Yucatán México. E-mail: [jramon@itaconkal.edu.mx](mailto:jramon@itaconkal.edu.mx). Rev. Científica, FCV-LUZ.

Gallegos, A. y Mellizo, E. (2006). Recuperación, evaluación y manipulación de los ovocitos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Reproducción animal (manual de prácticas).

Gally, G. y Lazzari, (2006). TECNOLOGÍAS EMBRIONARIAS. Laboratorio Argentino de Producción Animal. Tecnologías de la Reproducción, de Cremona y del Departamento Clínico Veterinario de la Univ. de Bolonia, Italia.

Hansen, M. (2002). Recuperación de ovarios colección y maduración de ovocitos (COCs). Universidad de Florida. Departament. Of animal science. Traducido Mayo 2007 por Luis A. Dávila.

Herradón, P. G., Quintela, L.A., Becerra, J. J., Ruibal, S. y Fernandez, M. (2007). Fecundación *in vitro*: Alternativa para la mejora genética en bovinos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl. 1). Lugo - España. pgarherr@lugo.usc.es

Ibañez, Q. V. (2003). Diseños Estadísticos. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Ingeniería Estadística e Informática. Puno, Perú.

IICA, (2002). Instituto Interamericano de Cooperación a la Agricultura. Estrategías para el desarrollo del altiplano Boliviano.

Illera, M. M. (1994). Reproducción de los animales domésticos. Facultad de veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. España. Ed. AEDOS.

López, A. C., Olivera, M. A., Ruiz, T. C. y Tarazona, A. M. (2007). Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo Reproducción Fisiología y Biotecnología Animal. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Colombia: angeladir7@gmail.

Limachi, F. (2008). Fertilización *in vitro* de ovocitos de llamas (*Lama glama*). Tesis de grado Universidad Católica Boliviana San Pablo - Ingeniería Zootécnica, La Paz Bolivia.

Lorenzo, P. G. L. (1992). Maduración *in vitro* de oocitos de ganado vacuno. Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria Universidad Complutense de Madrid- España.

Landinez, J., Baez, F., Pirela, A. y Villamediana, P. (2007). Efecto de la vitrificación sobre la sobrevivencia de ovocitos bovinos madurados *in vitro*. Universidad Central de Venezuela. Universidad del Zulia. Laboratorio de Citogenética. Maracaibo - Venezuela Rev. APPA - ALPA - Cusco, Perú.

Machicado G. R. (2009). Fertilización *in vitro* de oocitos de llama (*Lama glama*) obtenidos por super estimulación ovárica. Tesis de grado. Ingeniería Zootécnica. Universidad Católica Boliviana La Paz Bolivia.

Monforte, C. (2003). Congelación de embriones bovinos producidos *in vitro* Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Centro de Selección y Reproducción Animal, Gijón, Asturias.

Müller-Haye y Gelman J. (1981). Recursos genéticos animales en América Latina. Ganado criollo y especies de altura. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia.

Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F. y Alberio, R. H. (2006). Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de medios de cultivo con suero. Estación Experimental Balcarce, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Argentina. Arch. Med. Vet. 38, Nº 2.

PDM (2006 – 2010). Plan de Desarrollo Municipal del municipio de Tiahuanco, La Paz, Bolivia.

Ratto, M., Berland, M., Wolter R. y Matamoros M., (1999). Bovine embryo development produced by *in vitro* fertilization cultured with oviductal cell or conditioned medium and transfer to recipients. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D. Chile.

Romar, A. (2011). Efecto de las células oviductales y del *cumulus oophorus* sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina. Universidad de Murcia facultad de veterinaria. Departamento de Biología Animal. Murcia, España.

Rizos, A. (2007). Comparación entre novillas y vacas como donantes de ovocitos para la producción *in vitro* de embriones Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos. INIA – Madrid.

Ruiz, J., Correa J. E. y Martínez M. (2007). Vitrificación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogenético de embriones. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Unidad de Animales Transgénicos, Genómica Funcional, Valdivia, Chile; [jaimeruiz@uach.cl](mailto:jaimeruiz@uach.cl), [jarube2801@gmail.com](mailto:jarube2801@gmail.com).

Robledo, V. J. M., Herrera, C. J., Cajero, J. M., Navarro M. M. C. y García V. A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. Universidad Autónoma Metropolitana. Posta Zootécnica, México. E-mail: [josheca@hotmail.com](mailto:josheca@hotmail.com).

Rausell, F., y Tarín, J. (2005). Function of reduced glutathione during oocyte maturation and fertilization and pre-implantation embryo development *in vitro* in mammals. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física, Facultad de Ciencias. Biológicas, Universitat de Valencia, España.

Rivas, C. R. (2011). Manual de Prácticas De Biología De La Reproducción. Universidad Autónoma De Ciudad Juárez Instituto De Ciencias Biomédicas Departamento De Ciencias Químico-Biológicas Biología De La Reproducción Revisado por: Academia de Biología. Ciudad Juárez, Chihuahua- México.

Sintex G. (2005). Manejo Reproductivo En Bovinos De Leche. Laboratorio de Especialidades Veterinarias. [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar).

Sánchez, R. A., López, Z. L., Silva, J. M. y Berland, O. M., (2006). *In vitro* maturation of cat oocytes obtained from females treated with follicle stimulating hormone. Universidad Católica de Chile. E-mail: [asanchez@uvm.cl](mailto:asanchez@uvm.cl) Rev. Cient. (Maracaibo) v.16 n.2 Maracaibo mar.

Segura, C. J. y Montes, R. C. (2001). Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán, México.

Sanchez, R. y Silva, J. (2003). Evaluation of ovarian response and oocyte quality in domestic cats treated with two administration schemes of follicle stimulating hormone (FSH). Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Temuco, Chile. Arch. Med. Vet. XXXV, N° 1.

Tur, R., Arroyo, G., Martínez, F., Carreras, O., Belil I., Coroleu, B. y Veiga, A. (2001). Maduración *in vitro* de ovocitos en el síndrome del ovario poliquístico (SOP) Barcelona, España.

Tur, R., Martínez, F., Arroyo, G., Carreras, O., Belil, I., Coroleu, B. y Veiga, A. (2007). Estado actual de la maduración *in vitro*. Servicio de Medicina de la Reproducción, Departamento de Obstetricia y Ginecología. Barcelona, España.

Wattiaux, M. A. (2004). La Función Reproductiva Del Ganado Lechero. Universidad de Wisconsin-Madison. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Madison, WI 53706 USA, phone: 608-265-4169, babcock@calshp.cals.wisc.edu.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### TIPOS DE MADURACIÓN DE CÉLULAS CUMULARES SEGÚN FACTORES

Técnica de recuperación	Medio de recuperación	Medio de maduración	tipo	Cantidad de ovocitos
Pun.Asp.	M-199+BSA	M-199+BSA	C	26
Pun.Asp.	M-199+BSA	M-199+BSA	B	39
Pun.Asp.	M-199+BSA	M-199+BSA	A	14
Pun.Asp.	M-199+BSA	IVF-TL	C	40
Pun.Asp.	M-199+BSA	IVF-TL	B	22
Pun.Asp.	M-199+BSA	IVF-TL	A	8
Pun.Asp.	Dulbecus	M-199+BSA	C	28
Pun.Asp.	Dulbecus	M-199+BSA	B	34
Pun.Asp.	Dulbecus	M-199+BSA	A	10
Pun.Asp.	Dulbecus	IVF-TL	C	35
Pun.Asp.	Dulbecus	IVF-TL	B	24
Pun.Asp.	Dulbecus	IVF-TL	A	8
Slicing	M-199+BSA	M-199+BSA	C	21
Slicing	M-199+BSA	M-199+BSA	B	28
Slicing	M-199+BSA	M-199+BSA	A	5
Slicing	M-199+BSA	IVF-TL	C	21
Slicing	M-199+BSA	IVF-TL	B	34
Slicing	M-199+BSA	IVF-TL	A	9
Slicing	Dulbecus	M-199+BSA	C	15
Slicing	Dulbecus	M-199+BSA	B	23
Slicing	Dulbecus	M-199+BSA	A	15
Slicing	Dulbecus	IVF-TL	C	22
Slicing	Dulbecus	IVF-TL	B	19
Slicing	Dulbecus	IVF-TL	A	10

ANEXO 2

PRUEBA DE CHI<sup>2</sup> PARA TIPOS DE MADURACIÓN DE CÉLULAS DEL CÚMULUS A EFECTO DE TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN

Estadístico	GL	valor	Probabilidad
Chi- cuadrado	2	4.5763	0.1015 n.s.
Chi-cuadrado de ratio de verosimilitud	2	4.5950	0.1005
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	4.1647	0.0413
Coeficiente Phi		0.0947	
Coeficiente de contingencia		0.0943	
V de Cramer		0.0947	

ANEXO 3

PRUEBA DE CHI<sup>2</sup> PARA TIPOS DE MADURACIÓN DE CÉLULAS DEL CÚMULUS A EFECTO DE MEDIOS DE RECUPERACIÓN

Estadístico	GL	valor	Probabilidad
Chi- cuadrado	2	2.1755	0.3370 n.s.
Chi- cuadrado de ratio de verosimilitud	2	2.1754	0.3370
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	0.3135	0.5755
Coeficiente Phi		0.0653	
Coeficiente de contingencia		0.0652	
V de Cramer		0.0653	

ANEXO 4

PRUEBA DE CHI<sup>2</sup> PARA TIPOS DE MADURACIÓN DE CÉLULAS DEL CUMULUS A EFECTO DE MEDIOS DE MADURACIÓN

Estadístico	GL	valor	Probabilidad
Chi- cuadrado	2	74.6804	<.0001 *
Chi- cuadrado de ratio de verosimilitud	2	78.2325	<.0001
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	2.0047	0.1568
Coeficiente Phi		0.3827	
Coeficiente de contingencia		0.3574	
V de Cramer		0.3827	

ANEXO 5

PRUEBA DE CHI<sup>2</sup> PARA MADURACIÓN NUCLEAR A EFECTO DE TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN

Estadístico	GL	valor	Probabilidad
Chi- cuadrado	1	3.4064	0.0649 n.s.
Chi- cuadrado de ratio de verosimilitud	1	3.4282	0.0641
Chi-cuadrado adj. de continuidad	1	3.0670	0.0799
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	3.3995	0.0652
Coeficiente Phi		0.0828	
Coeficiente de contingencia		0.0825	
V de Cramer		0.0828	

## ANEXO 6

### PRUEBA DE $\chi^2$ PARA MADURACIÓN NUCLEAR A EFECTO DE MEDIOS DE RECUPERACIÓN

Estadístico	GL	valor	Probabilidad
Chi- cuadrado	1	0.0145	0.9040 n.s.
Chi- cuadrado de ratio de verosimilitud	1	0.0145	0.9040
Chi-cuadrado adj. de continuidad	1	0.0007	0.9783
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	0.0145	0.9041
Coeficiente Phi		-0.0054	
Coeficiente de contingencia		0.0054	
V de Cramer		-0.0054	

## ANEXO 7

### PRUEBA DE $\chi^2$ PARA MADURACIÓN NUCLEAR A EFECTO DE MEDIOS DE MADURACIÓN

Estadístico	GL	valor	Probabilidad
Chi- cuadrado	1	10.5000	0.0012 *
Chi- cuadrado de ratio de verosimilitud	1	10.5342	0.0012
Chi-cuadrado adj. de continuidad	1	9.9036	0.0016
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	10.4788	0.0012
Coeficiente Phi		0.1454	
Coeficiente de contingencia		0.1438	
V de Cramer		0.1454	

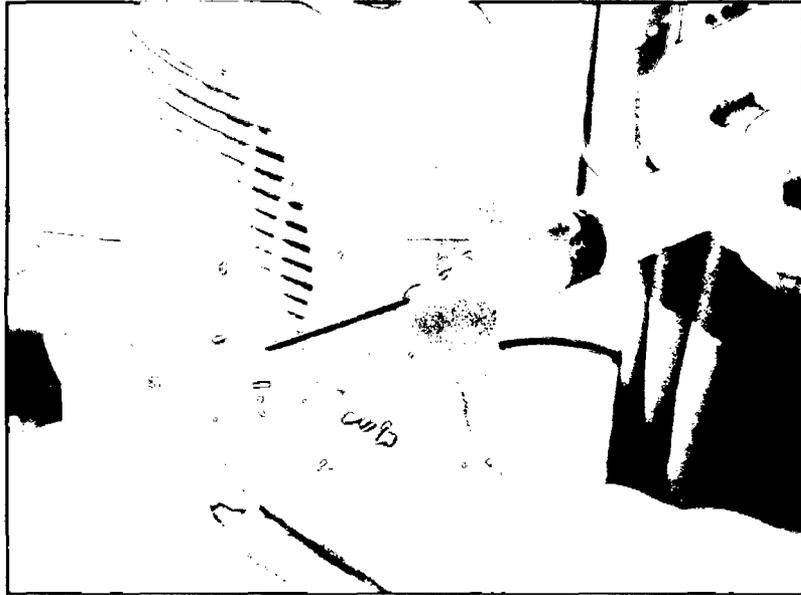
## ANEXO 8

### OBTENCIÓN DE OVARIOS DE LOS RASTROS DE MATADERO



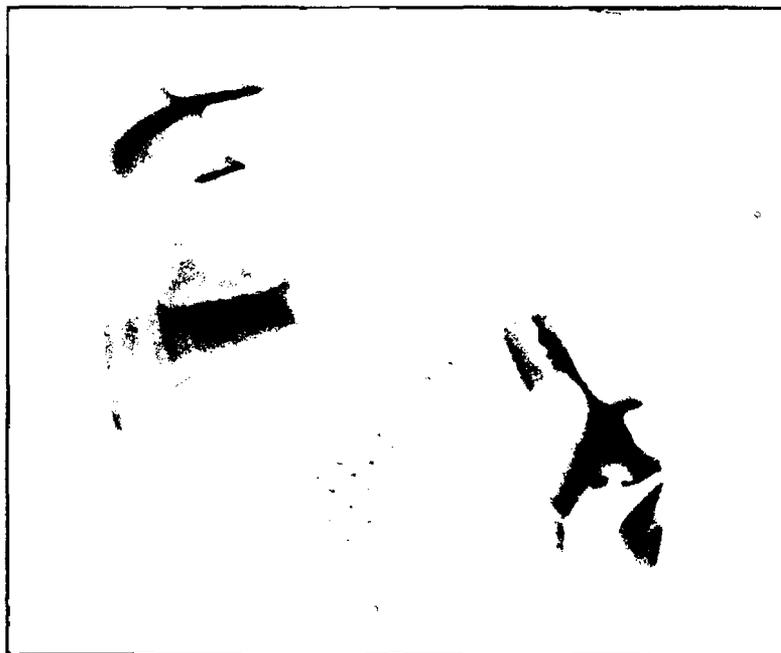
ANEXO 9

RECUPERACION DE OVOCITOS POR PUNCIÓN ASPIRACIÓN



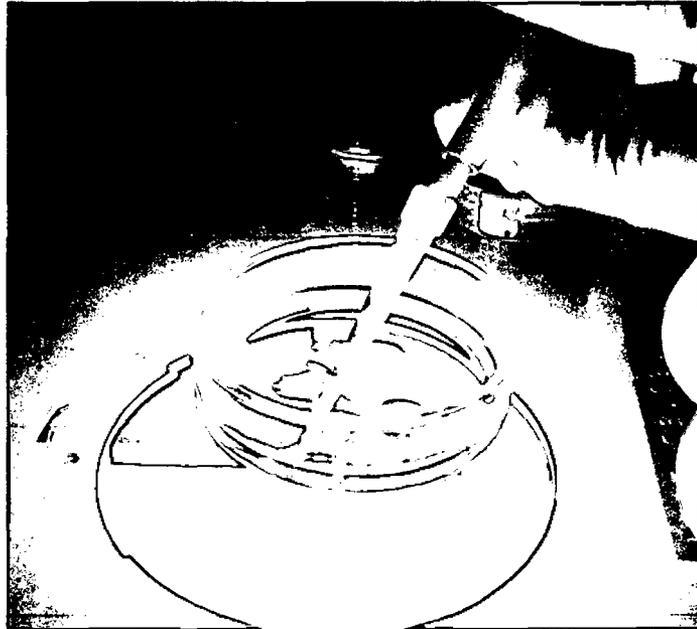
ANEXO 10

RECUPERACION DE OVOCITOS POR LA TÉCNICA SLICING



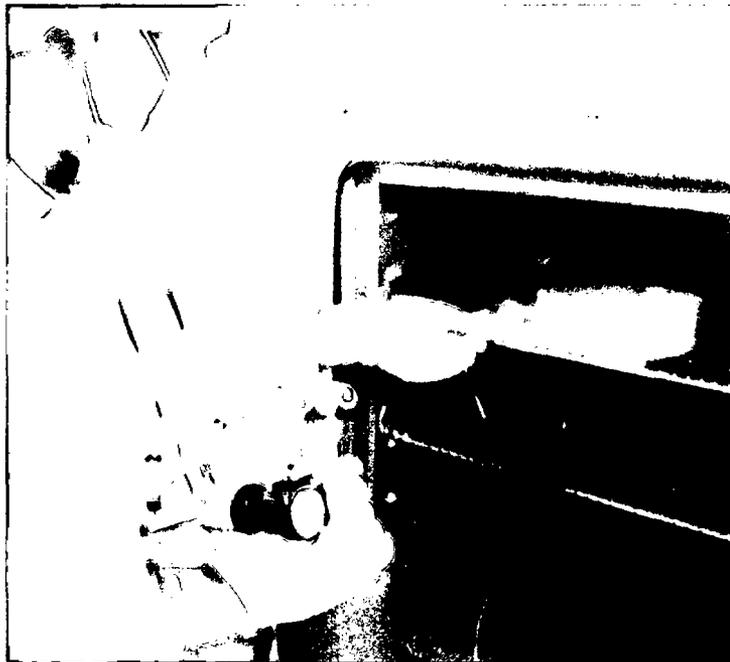
ANEXO 11

MANIPULACION DE OVOCITOS EN MEDIO DE RECUPERACIÓN



ANEXO 12

CÁMARA DE CULTIVO CELULAR, ALIMENTADO CON GASES



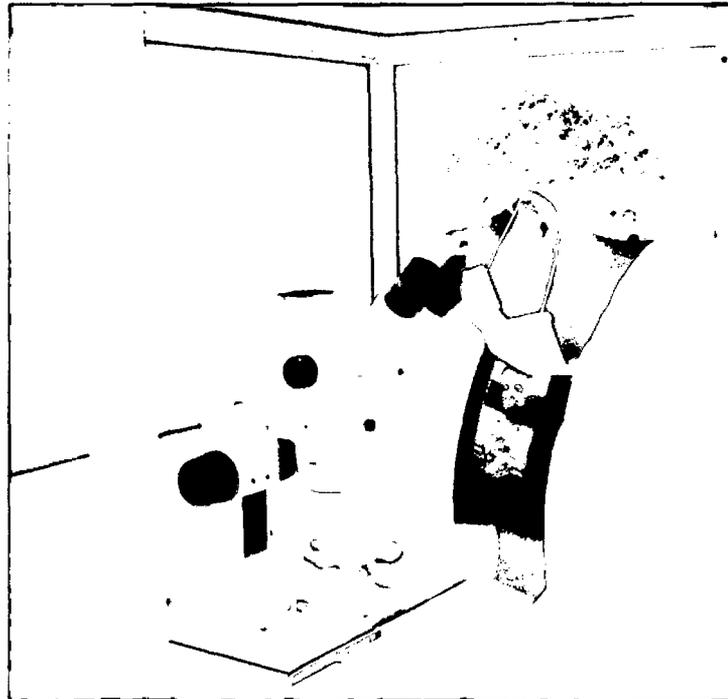
ANEXO 13

CAMARA DE CULTIVO CELULAR CONTENIENDO EN SU INTERIOR  
PLACAS PETRI CON OVOCITOS EN PROCESO DE MADURACIÓN



ANEXO 14

EVALUACION DE OVOCITOS EN ESTEREO MICROSCOPIO



ANEXO 15

OVOCITO SEMI DESNUDO, PERTENECIENTE AL TIPO C



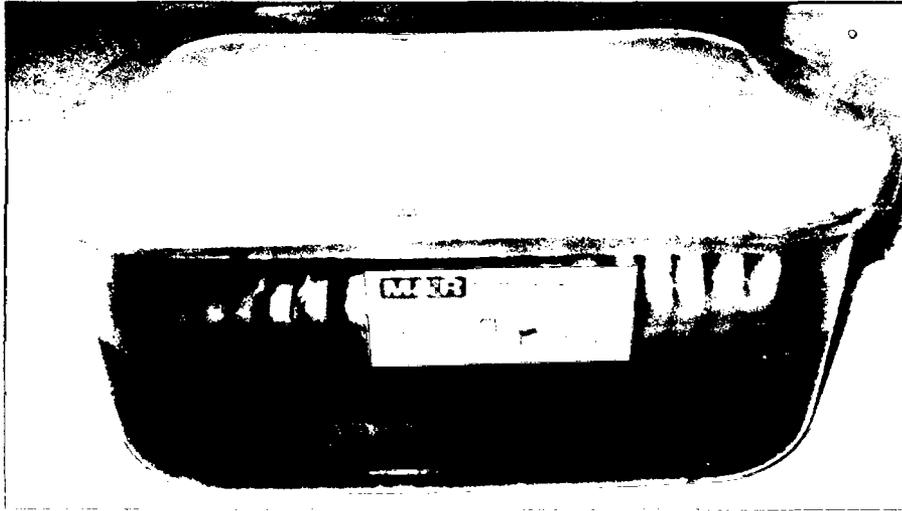
ANEXO 16

OVOCITO CON CUATRO CAPAS DE CELULAS DEL CÚMULUS,  
PERTENECIENTE AL TIPO B



**ANEXO 17**

**PLACAS CON OVOCITOS SUMERGIDOS EN SOLUCION ACIDO GLACIAL  
ACETICO Y ORCEINA**



**ANEXO 18**

**OVOCITO MADURO CON FORMA CIRCULAR DEFINIDA Y PRESENCIA DEL  
PRIMER CORPÚSCULO POLAR**

