

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“EFECTO DEL SUERO DE OVEJA SÚPER OVULADA SOBRE
LA MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS DE
OVINO”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. JORGE DICK CHAVEZ ZAPANA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

“Efecto del suero de oveja súper ovulada sobre la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de ovino”

PRESENTADA POR:

Bach. JORGE DICK CHAVEZ ZAPANA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR:

PRESIDENTE

:


MVZ. JOEL GUIDO FLORES CHECALLA

PRIMER MIEMBRO

:


MVZ. CIRIACO TEODORO ZUÑIGA ZUÑIGA

SEGUNDO MIEMBRO

:


MVZ. WILBUR RUBEN AYMA FLORES

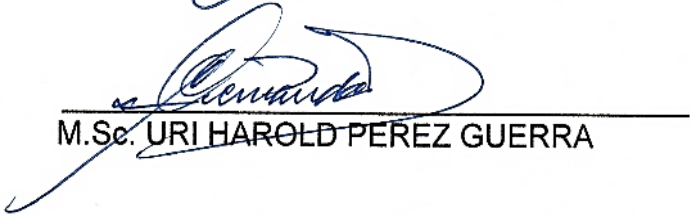
DIRECTOR

:


Dr. MANUEL GUIDO PEREZ DURAND

ASESOR

:


M.Sc. URI HAROLD PEREZ GUERRA

Área : Reproducción animal
Tema : Conservación de gametos

DEDICATORIA

A mi Dios Jehová, quien me dio la sabiduría, la fe, la salud y la fortaleza para llegar hasta aquí.

A mis queridos padres Lidia y Adolfo, quienes siempre me apoyaron y estuvieron con migo en mis mejores y peores momentos.

A la gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a sus docentes, ejemplo de superación quienes nos imparten sus conocimientos y sabias experiencias.

AGRADECIMIENTOS

- *A Dios Jehová por haberme encaminado a obtener el grado académico y guiar mis pasos.*
- *A la Gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia alma mater de mi formación profesional y a cada uno de sus docentes quienes me impartieron sus conocimientos y sabias experiencias.*
- *A mi asesor Dr. Guido Pérez D. por su valiosa orientación en la ejecución del presente trabajo.*
- *A los miembros del jurado Dr. Guido Joel Flores Checalla, Dr. Ciriaco Teodoro Zuñiga Zuñiga y a Dr. Wilbur Ayma Flores.*
- *A mis padres Adolfo Chávez y Lidia Zapana, a mi hermano Miguel Edward, por haber confiado en mí y gracias a su motivación y comprensión pude seguir adelante y concluir satisfactoriamente con este trabajo de investigación.*
- *A mis compañeros, amigos y hermanos; Darwin Calderón, Junior Ccopa, Manuel Pfuño, Harrisson Lucho y Luis Aguirre; gracias por su amistad y apoyo incondicional.*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
I. INTRODUCCIÓN	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL TRACTO GENITAL DE LA OVEJA	14
2.1.1. Anatomía	14
2.1.2. Fisiología	14
2.2. OVOGENESIS	16
2.2.1. Proliferación	16
2.2.2. Crecimiento.....	17
2.2.3. Maduración	17
2.3. FOLICULOGENESIS.....	17
2.4. MADURACIÓN DE OVOCITOS OVINOS.....	19
2.4.1. Recolección de ovarios en matadero	20
2.4.2. Obtención de los ovocitos ovinos	20
2.4.3. Selección de los ovocitos ovinos.....	21
2.5. MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS OVINOS	22
2.5.1. Denudación y lavado de los ovocitos madurados.....	24
2.5.2. Evaluación morfológica de la maduración de los ovocitos ovinos	25
2.6. MEDIOS DE CULTIVO	26
2.6.1. Suplementación del medio de cultivo.....	27
2.6.2. Suero Sanguíneo de oveja en época no reproductiva	28

2.6.3. Antecedentes	30
2.6.4. Fertilización de ovocitos Ovinos	32
2.7. PREPARACIÓN DEL SEMEN	32
2.8. FERTILIZACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS	33
2.8.1. Evaluación morfológica de la fertilización	34
2.8.2. Medios empleados y tiempo de fertilización	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO	35
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL	35
3.3. METODOLOGÍA	36
3.4. MADURACIÓN DE OVOCITOS	38
3.5. FERTILIZACIÓN DE LOS OVOCITOS	40
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	45
4.1. MADURACIÓN <i>in vitro</i> DE OVOCITOS OVINOS	45
V. CONCLUSIONES	53
VI. RECOMENDACIONES	54
VII. REFERENCIAS	55
ANEXOS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Incubadora de cámara CO2 para cultivos embrionarios (modelo MMM adcenterGmbH M-Group	70
Figura 2: Gotas de 50 µL medio de maduración en placas de 35 mm con cubiertas con aceite mineral, y tuberculina con puntero adosado..	70
Figura 3: Bomba de CO2.	71
Figura 4: Jeringas de tuberculina adosadas a tips o punteros para manipulación de ovocitos.	71
Figura 5: Jeringa sin embolo de goma y aguja N° 18 para aspiración folicular.	72
Figura 6: Micro-dispensador para fertilización ovocitaria.....	72
Figura 7: Recolección del Suero de Oveja Súper Ovulada en el CIP Carolina – Universidad Nacional del Altiplano –Puno.....	74
Figura 8: Procesamiento del Suero de Oveja Súper ovulada.	74
Figura 9: Procesamiento del Suero de Oveja Súper ovulada.	75
Figura 10: Suero de Oveja Súper Ovulada Procesado.....	75
Figura 11: Almacenamiento del Suero de Oveja Súper Ovulada.....	76
Figura 12: Centro de Beneficio cárnico Camal llave.....	78
Figura 13: Recolección de ovarios del centro de beneficio.....	78
Figura 14: Aspiración folicular.	79
Figura 15: Ovocitos de categorías A, B, C y D. (40X)	79
Figura 16: Ovocitos maduros con cúmulus expandido. (40X).....	80
Figura 17: Ovocito maduro con presencia de I corpúsculo polar.	80
Figura 18: Pajilla de semen congelado.	81
Figura 19: Lavado del semen sedimentación y re suspensión en medio BO..	81
Figura 20: Capacitación espermática Swim up.	82
Figura 21: Fertilización.....	82
Figura 22: Grado I.....	84
Figura 23: Grado II.....	85
Figura 24: Grado III.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1: Distribución de los de ovocitos de ovinos para su maduración dentro de tratamientos con TCM (medio de cultivo tisular) y la adición de suero de ovino (10%)	35
Tabla 2: Distribución de ovocitos de ovinos madurados, utilizados para la fertilización con el medio de fertilización y la adición suero de ovino. (10%)	36
Tabla 3: Porcentaje de maduración de ovocitos ovinos por tratamientos a las 24 horas.	45
Tabla 4: Porcentaje de fertilización in vitro de ovocitos ovinos madurados en diferentes medios.	50
Tabla 5: Solución Buffer Fosfato Salino (PBS)(stock)	66
Tabla 6: Medio de maduración TCM-199	66
Tabla 7: Medio Fert-Talp.....	67
Tabla 8: Medio Sperm-Talp.....	67
Tabla 9: Medio de maduración TCM-199 + 10% Suero Oveja época no reproductiva	68
Tabla 10: Medio de maduración TCM-199 + 10% Suero Oveja Superovulada	68

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

CIP	: Centro de investigación y producción
COCs	: Complejo ovocitos células del cúmulus ophorus
Ecg	: Gonadotropina coriónica equina
EGF	: Factor de crecimiento epidermal
FSH	: Hormona folículo estimulante
GnRH	: Hormona liberadora de las gonadotropinas
HECM-9	: Medio de cultivo para embriones de hamster
IATF	: Inseminación artificial a tiempo fijo
IFI	: Inmunofluorescencia
IGF	: Factores de crecimiento ligados a la insulina
LH	: Hormona luteinizante
PBS	: solución fosfato-tamponada salina
PHE	: Penicilina, hipotaurina , epinefrina
PGF2a	: Prostaglandina f 2 alfa
SFO	: Suero fetal ovino
SOENR	: Suero de oveja en época no reproductiva
SOSO	: Suero de oveja superovulada
TCM	: Medio de cultivo tisular
TE	: Transferencia de embriones
VG	: Vesícula germinal

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional del Altiplano –Puno, ubicado a 3812 metros de altitud; durante los meses de Enero a Junio del 2016, con el objetivo de describir el efecto del suero de oveja súper ovulada sobre la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos. Para lo cual se utilizó ovarios de ovinos hembra después de ser beneficiadas en el Camal Municipal de llave, a su vez se súper ovulo ovinos hembra y se utilizó el suero para la preparación del medio de maduración y fertilización con medio tcm-199. La significancia se analizó mediante la prueba de t de student. El promedio de maduración en el grupo control o Suero de oveja en época no reproductiva fue de 79.29% mientras que el promedio de maduración en el Suero de oveja Superovulada fue de 95.51%. El promedio de fertilización en el grupo control o Suero de oveja en época no reproductiva fue de 59.50% mientras que el promedio de fertilización en el suero de Oveja Superovulada fue de 67.14%. De acuerdo a los resultados podemos concluir que el efecto del suero de oveja Superovulada en la maduración y fertilización *in vitro* tiene una mejor funcionalidad en comparación del suero de oveja en época no reproductiva.

Palabras clave: Maduración y fertilización *in vitro*, medios, oveja, ovocito, reproductiva, suero, superovulación.

ABSTRACT

The research work was carried out in the Laboratory of Animal Reproduction of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, of the National University of the Altiplano -Puno, located at 3812 meters of altitude; during the months of January to June 2016, with the aim of describing the effect of super ovulated sheep serum on the maturation and in vitro fertilization of oocytes. For which ovaries of female sheep were used after being benefited in the Municipal Camal de llave, in turn ovules were female ovules and the serum was used for the preparation of the medium of maturation and fertilization with medium tcm-199. The significance was analyzed by the student's t-test. The average maturation in the control group or sheep serum in non-reproductive era was 79.29% while the average maturation in the Superovulated sheep serum was 95.51%. The average fertilization in the control group or sheep serum in non-breeding season was 59.50% while the average fertilization in the S uperovulated sheep serum was 67.14%. According to the results we can conclude that the effect of Superovulated sheep serum in maturation and in vitro fertilization has a better functionality compared to sheep serum in non-breeding season.

Keywords: maturation and in vitro fertilization, mids, sheep, oocyte, reproductive, serum, superovulation.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de ovinos depende de muchas variables productivas, como los sistemas de crianza, el valor genético, la alimentación, manejo sanitario. La crianza de ovinos se realiza en casi todas las regiones del país, bajo un sistema extensivo, con crianza mixta de vacunos y camélidos sudamericanos. La mayor población de ovinos se encuentra en la Sierra: 8 815 333 que representa el 94.4% de la población nacional de ovinos, en la Costa: 460 889 equivalente al 4.9% y en la Selva: 0.7% según fuente INEI (IV Censo Nacional Agropecuario 2012). El ovino proporciona carne y leche para la alimentación del hombre, lana y pieles para la confección de prendas de vestir, abono para mejorar los suelos de cultivo, y para el campesino muchas veces como herencia de padres a hijos o fiestas costumbristas, existen una diversidad de usos para cada uno de los productos que hemos indicado; es un animal que consume pastos donde otras especies están limitadas, en terrenos marginales de cultivos y pastoreo; estas características lo han hecho compañero del hombre en las diferentes migraciones, conquistas y descubrimientos de nuevas tierras, haciéndose cosmopolita (Alencastre, 1997). Existen técnicas reproductivas en ovinos tales como la Inseminación artificial, Transferencia de embriones, sincronización de celo, etc. La inseminación artificial (IA) es una técnica de reproducción por la cual, el semen de los machos colectado artificialmente, es depositado en el tracto reproductivo de las hembras para producir la fecundación de los óvulos maduros. La transferencia de embriones (TE) es un método de reproducción asistida basado en la producción de múltiples embriones, por una hembra donante (madre genética superior) y transferidos antes de la edad de implantación, en varias hembras receptoras

(madres portadoras gestantes) (Mueller, 1993). En ovinos se ha probado que la maduración *in vitro* de ovocitos es una técnica invaluable para la producción de un mayor número de embriones provenientes de animales de alto valor genético en países desarrollados a un costo menor que con el empleo de las prácticas convencionales de superovulación y producción de embriones (Vivanco, 1992). Por estas razones, es que nace la necesidad de abrir nuevos caminos y técnicas de biotecnología reproductiva en ovinos, de tal manera que se puedan realizar mejoras en los métodos que existen hoy en día. En este trabajo de investigación, se buscaron alternativas viables a esta problemática, utilizando material biológico tomado de un matadero en la Provincia de Ilave, y poniendo a prueba un medio de cultivo enriquecido con un suplemento prácticamente nuevo que es el suero de oveja Superovulada (Arroyo, 2006) Por lo tanto los objetivos del presente trabajo son: Primeramente determinar el porcentaje de maduración y fertilización utilizando suero sanguíneo de oveja Superovulada, también determinar el porcentaje de maduración y fertilización utilizando el suero de oveja en época no reproductiva y determinar el efecto del suero sanguíneo de la oveja Superovulada sobre la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos ovinos (*Ovis aries*).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL TRACTO GENITAL DE LA OVEJA

2.1.1. Anatomía

El aparato reproductor de la oveja consta de: 2 ovarios, 2 conductos ováricos o trompas de Falopio, el útero, la vagina y la vulva. Se parecen en general a los de la vaca, pero se deben de resaltar cierto número de caracteres especiales. No existe demarcación entre la trompa uterina y el cuerno del útero, la trompa es muy flexuosa cerca del infundíbulo. El útero se asemeja al de la vaca, mide entre 10 a 12 cm y se adelgaza en punta de tal manera que su unión con las trompas uterinas se hace insensiblemente, no permitiendo distinguir con claridad el punto de separación entre estos dos órganos, los cuernos son ondulados formando una espiral cerrada. Los cotiledones son mucho menores que los de la vaca y presentan una depresión en su cara libre. (Regueiro, 2010)

2.1.2. Fisiología

La característica más importante en la fisiología reproductiva de la oveja es la presencia de anestro estacional. La actividad ovárica anual comprende dos períodos más o menos marcados según sea la latitud donde esta especie se ha desarrollado. Estos períodos son, la estación de actividad sexual o época de apareamiento y la estación de anestro o contra estación. El período de actividad sexual se caracteriza por presentar una serie de estros acompañada de ovulaciones. Si la oveja no queda preñada, estos ciclos se suceden en forma regular, lo que le

permite a la hembra contar con repetidas oportunidades de copular y quedar preñada. Un ciclo estral se considera normal cuando su duración es de 14 a 19 días, sin embargo existe una gran frecuencia de ciclos más largos y más cortos, al inicio y al final de la estación de apareamiento. (Regueiro, 2010)

El ciclo estral comprende dos grandes fases, dominada por la estructura presente en el ovario. La fase folicular y la fase lútea. La Fase folicular es el período que se extiende entre la luteólisis (ruptura del cuerpo lúteo) y la ovulación. Durante esta fase la estructura ovárica primaria es el folículo pre-ovulatorio, el cual produce gran cantidad de estrógenos y contiene en su interior al óvulo. Esta fase tiene dos períodos, el proestro y el estro.

Proestro: dura entre 2 y 5 días dependiendo de la raza. Durante esta fase se desarrollan varios folículos, de los cuales entre 1 y 4 dependiendo de la raza llegarán a ovular. (Gordon, 1996)

Estro: Es el período más fácil de reconocer en la hembra y se caracteriza por el comportamiento que permite el apareamiento, además se observa aumento en la locomoción, inquietud, movimiento de la cola, búsqueda del macho, micciones frecuentes y sobretodo la inmovilidad cuando es montada por el macho, puede observarse también edematización de la vulva y la presencia de un moco viscoso. El celo dura cerca de 30 horas aunque es muy variable según la raza. Por lo general se considera día 1 del ciclo estral el día de comienzo del estro.

La ovulación tiene lugar unas 30 horas después de iniciarse el estro.
(Galina y Valencia, 2008)

La fase lútea se extiende desde la ovulación hasta la luteólisis, la estructura dominante es o son los cuerpos lúteos y la principal hormona producida por ellos es la Progesterona. La fase lútea presenta dos períodos, el metaestro y el diestro. (Rivadeneira, 2013)

Metaestro: Es corto y se inicia después de la ovulación, cuando el folículo se llena de sangre y se transforma en cuerpo hemorrágico y termina cuando este se transforma en cuerpo lúteo o amarillo.
(Rivadeneira, 2013)

Diestro: Es la fase más extensa del ciclo, puede durar 13 días y se caracteriza por la secreción de progesterona. Si la hembra no ha quedado preñada luego de 11 a 12 días el cuerpo lúteo sufre la luteólisis, por acción de la prostaglandina F₂α, sintetizada por el útero y aquí finaliza el diestro. (Rivadeneira, 2013)

2.2. OVOGENESIS

Es el proceso de desarrollo de las células germinativas femeninas. Incluye la formación y la maduración de las células e incluye tres procesos:

2.2.1. Proliferación

Es una etapa fetal, mitótica en la que se forma un número determinado de ovocitos primarios que más tarde van a cumplir una función, pero muchos de ellos desaparecen al momento del nacimiento.

2.2.2. Crecimiento

En esta fase el ovocitos aumenta de tamaño, se forma la zona pelúcida, células de la granulosa y células de la teca, los óvulos migran al interior del ovario. Esta es una fase mitótica que comienza antes de la pubertad.

2.2.3. Maduración

Esta etapa se da después de la pubertad, la primera meiosis se da en plena ovulación y la segunda meiosis en el momento de la fertilización. La primera división meiotica da origen al ovocitos secundario y la eliminación del primer cuerpo polar. Aquí se lleva a cabo la ovulación. La segunda división meiotica se activa por el nemaspermo en el ovulo y produce al cigoto y al segundo cuerpo polar. (Aisen, 2004)

2.3. FOLICULOGENESIS

Foliculogénesis es el proceso de crecimiento que experimenta el folículo desde el momento que deja la población de reserva, constituida por folículos primordiales, hasta su ovulación o atresia. Los folículos son reclutados continuamente hasta que la reserva se termina. Los folículos se clasifican en: Folículos primordiales, Folículos preantrales (folículos primarios y secundarios), Folículos antrales y preovulatorios. El folículo ovárico es una unidad altamente compleja y consiste de distintos tipos de células somáticas. El folículo provee un microambiente para el crecimiento del ovocitos y es el responsable para la producción de Hormonas. (Gordon, 1996)

La foliculogénesis es un proceso lento, que comienza 120 días antes de la ovulación, e involucra el pasaje de los folículos por 5 estadíos de

desarrollo: primordiales, comprometidos, sensibles a las gonadotropinas, dependientes de las gonadotropinas y folículos ovulatorios. (Scaramuzzi *et al.*, 1993)

La foliculogénesis en el ovario de especies poco prolíficas, como la ovina o caprina, se caracteriza por el desarrollo simultáneo de subpoblaciones de folículos que presentan características funcionales diferentes, según su capacidad de respuesta y grado de dependencia del aporte de gonadotropinas hipofisarias, FSH y LH. El crecimiento folicular en los estadios preantrales sería independiente de ambas gonadotropinas. La aparición y aumento de tamaño del antrum dan lugar a una serie de cambios funcionales en el folículo que determinan su entrada en la fase de crecimiento terminal rápido. Los primeros estudios de dinámica folicular durante el ciclo sexual en pequeños rumiantes mediante ultrasonografía fueron realizados en ovejas con ovulación múltiple (Schrick *et al.*, 1993), y mostraron que la entrada de los folículos en la fase de crecimiento terminal se produce de forma continua. Algunos de estos folículos alcanzan el tamaño preovulatorio, aunque no llegan a ovular, tanto durante la fase folicular como la fase lútea (Ravindra *et al.*, 1994). Sin embargo, existen días durante el ciclo en que se ve aumentado el número de folículos en desarrollo (1-9); lo que para Ginther *et al.* (1995), constituyen una onda de crecimiento similar a las descritas en el ciclo sexual de la vaca. En ovejas prolíficas no se observa tampoco que los folículos de tamaño preovulatorio existentes durante la fase lútea ejerzan una dominancia similar a la descrita en vacuno (Guilbault *et al.*, 1991). La misma controversia existe entre los

resultados obtenidos en cabras, con estudios que han identificado ondas de crecimiento (Ginther y Kot, 1994), y estudios que han identificado crecimiento continuo en el caso de las cabras de raza Murciano-Granadina. (González-Bulnes *et al.*, 1999)

2.4. MADURACIÓN DE OVOCITOS OVINOS

Durante el proceso de maduración tanto *in vivo* como *in vitro* de los ovocitos ocurren una serie de cambios, que permiten la reanudación de la meiosis. Estos eventos deben ocurrir antes de la fertilización y se caracterizan por la expansión de las células del cúmulo, la eliminación del primer corpúsculo polar y la formación de la metafase II. *In vivo*, la hormona FSH es responsable de la inducción de la maduración de los folículos y la hormona LH promueve la reanudación de la meiosis de los ovocitos. (Ginther, 1994)

Las células del cúmulo también desempeñan un papel importante en la maduración de los ovocitos. Estas células aportan nutrientes y energía (piruvato) al ovocito, También secretan ácido hialurónico a la matriz externa de proteoglicanos. Esta secreción provoca la ruptura de la matriz, lo que trae aparejado el fenómeno denominado expansión del cúmulo, dominado por la acción de la FSH y se caracteriza por el cambio de interacción entre las células del cúmulo y el ovocito. La maduración *in vitro* de los ovocitos requiere el cumplimiento de los siguientes pasos: Recolección de los ovarios en el matadero, obtención de ovocitos, selección de los ovocitos y maduración *in vitro* de los ovocitos. (Ginther, 1994)

2.4.1. Recolección de ovarios en matadero

La recolección de ovarios en el matadero se realiza mediante la intervención del recolector en el inicio de la cadena de matanza. Los ovarios se obtienen dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales. Los ovarios recogidos son colocados en un termo que contiene solución salina (0.9% NaCl), o solución fosfato-tamponada salina (PBS). (Thompson, 2007)

Los ovarios de ovino son colocados en baño María a 30°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos. (Fry *et al.*, 1997)

2.4.2. Obtención de los ovocitos ovinos

Existen diferentes métodos para la colección de los ovocitos:

- Aspiración folicular: Se aspiran los folículos claros y transparentes entre 2 y 5 mm de diámetro con agujas de 18 g acopladas a jeringas de 5 ml. El fluido folicular conteniendo los ovocitos deben ser colocados en tubos Falcon de 15ml, protegidos de la luz el procedimiento será llevado a cabo de 25 a 27°C.
- * Se aspiran el contenido de los folículos, con un diámetro de entre 2 – 10 mm de diámetro, con agujas 18 G en jeringas de 2 ml. El líquido folicular aspirado será colocado en una placa de cultivo de 3 cm. de diámetro, y con ayuda de un microscopio invertido y una micro pipeta se recogieron únicamente los ovocitos que mostraban un cúmulo celular compacto y un citoplasma uniforme. (Ocaña-Quero, 1994)

- Técnica de slicing: consiste en la realización de cortes longitudinales y transversales con una hoja de bisturí, en la superficie del ovario para liberar el contenido folicular en una placa de cultivo. Se observan los complejos al microscopio y se seleccionaron aquellos que presenten una o más capas de l células del cúmulo no expandidas y un citoplasma ovocitario homogéneo. (Universidad de Cataluña, 2005)
- Combinación entre los métodos de aspiración y slicing cubiertos parcialmente por medio de manejo. Y se seleccionaron para madurar los ovocitos con citoplasma homogéneo y varias capas de células de la granulosa. (Casao, 2007)

2.4.3. Selección de los ovocitos ovinos

La morfología que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios, nos brinda la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis. Los ovocitos obtenidos en el laboratorio son clasificados y seleccionados para ser madurados in vitro, según el aspecto que presenta su citoplasma y las células del cúmulo que lo envuelven, en el año 1979, se propone el siguiente esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia de las células del cúmulo. Los ovocitos se pueden clasificar en cuatro categorías: Categoría A, Presentan tres capas compactas de células del cúmulo que los rodean en toda su superficie; Categoría B, Se presentan rodeados parcialmente por tres capas compactas de células del cúmulo; Categoría C, Se encuentran rodeados por células del cúmulo expandidas y semidesnudos; Categoría D, Ovocitos

desnudos, dentro de los cuales los considerados aptos para ser sometidos a procedimientos de maduración y fertilización *in vitro* son los de categorías A y B, siendo este un factor de exclusión. (Leibfried y First, 1979)

2.5 MADURACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS OVINOS

La maduración de ovocitos *In vitro*, es una técnica poco estudiada en ciertas especies, ya que en la mayoría de los casos, es aplicada únicamente a los bovinos, por ser una especie de mayor interés y de las cuales se conoce muy bien su proceso reproductivo. Especies como los ovinos, por ejemplo, no han sido muy estudiadas en este campo de la maduración ovocitaria, sin embargo, se han presentado trabajos en los cuales la maduración de ovocitos *In vitro* ha dado buenos resultados.

Un trabajo muestra que los ovocitos inmaduros son depositados en microgotas (5u) de medio de cultivo TCM-199, suplementado con 10% de suero fetal inactivado (56° C/30 min), gonadotropinas: (5ug LH/ml, 2.5ug FSH/ml y estradiol 17B (1ug/ul). Células de la granulosa son igualmente adicionadas a una concentración de 5 -10 células /ml. Los ovocitos depositados en microgotas (50ul) de medio de maduración son madurados durante 24-26 horas a 39°C bajo una atmosfera de aire 5% CO₂ y alta humedad (95%). (Walker, 1988)

Otro autor menciona la maduración *in vitro* de 2 maneras: De un total de 375 COC colectados, 120 de ellos clasificados como grados 1 y 2, fueron seleccionados para su cultivo *in vitro*, distribuyéndose aleatoriamente en los dos medios de maduración a evaluar: 57 COC

fueron colocados en HECM-9 y 63 en TCM-199; lavándose previamente, en el medio de maduración correspondiente en 3 ocasiones consecutivas. Para su manejo, se colocaron grupos de 10-15 COC en 450 μ L de medio por cada pozo, cubriéndose con aceite mineral, incubándose durante 24 h, a 38.5° C y 5 % de CO₂, en aire saturado de humedad. El TCM-199 fue suplementado con bicarbonato de sodio, piruvato de sodio 0.91mM, D-glucosa 3.05mM y cisteína 0.57mM. El HECM-9, fue elaborado con medio básico-3 o BM- 3 (NaCl 113.6 Mm, KCl 3.0 Mm, MgCl₂-6H₂O 0.46 Mm, NaHCO₃ 25.0 Mm, DL Lactato de sodio 4.5 Mm, HCl 0.0014 Mm, CaCl₂-2H₂O 1.9 Mm), suplementado con 11 aminoácidos (L-Ácido Aspártico 0.01 Mm, L- Ácido Glutámico 0.01 Mm, L-Asparangina 0.01 Mm, L-Cisteina 0.01 Mm, L-Glicina 0.01 Mm, LGlutamina 0.2 Mm, L-Histidina 0.01 Mm, L-Lisina 0.01 Mm, L-Prolina 0.01 Mm, L-Serina 0.01 Mm, Taurina 0.5 Mm) y pantotenato 3.0 Mm; Ambos medios de maduración fueron enriquecidos con 0.5 μ g/ml de FSH, 0.5 μ g/ml de LH, 10ng/ml de EGF, 75 μ g/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomicina, ajustándose el pH a 7.0-7.2. (McKiernan y Bavister, 2000)

En un trabajo de maduración *in vitro* se indica que los ovocitos se obtuvieron a partir del corte con una hoja de bisturí estéril de folículos de 2 a 6 mm de diámetro, posteriormente al corte del folículo se lavó con medio TCM- 199 suplementado con 100 UI/mL de heparina, 4 mg/mL de Gentamicina (10), y 25 mM de HEPES (O' Brien JK, 1996). El líquido folicular y el medio de lavado se recibieron en cajas de petri, el contenido de la caja reposó 15 minutos para permitir que las células se depositaran

en el fondo, posteriormente se realizó la búsqueda de los complejos ovocitos células del cúmulo (COCs), en un microscopio invertido utilizando el objetivo 4X. Los ovocitos con 3 ó más capas de células del cúmulo y citoplasma homogéneo fueron cultivados. (Gordon, 1994)

El medio de maduración consistió en TCM 199 suplementado con 10% de Suero Fetal ovino (SFO) inactivado por calor, 0.3 mM de piruvato, 1 mM de glucosa (Ali, 2002), y Penicilina 100 UI/mL, Estreptomina 100 mg/mL. Los medios de cultivo se esterilizaron a través de filtros con poros Millipore de 0.22 mm de diámetro y se equilibraron 24 horas antes de utilizarse en cajas de cultivo Nunc de cuatro pozos con gotas de 50 mL de medio de maduración cubiertas con aceite mineral, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 38.5°C de temperatura. Para la maduración los ovocitos fueron incubados en estas mismas condiciones durante 22 horas. (Byrd, 1997)

2.5.1. Denudación y lavado de los ovocitos madurados

Una vez transcurrido el periodo de incubación, los ovocitos fueron denudados de las células del cúmulo (Ali, 2002) mediante pipeteo vigoroso y repetido con una pipeta Pasteur, y se fijaron en una solución [3alcohol-ácido acético] durante 24 horas. Para diferenciar el material nuclear se tiñeron por capilaridad con una solución de orceína acética [1% de orceína en 45% de ácido acético]. Con el objetivo de determinar el estado de meiosis de los ovocitos, se examinaron en un microscopio de contraste de fases a 100X. Se tuvo en cuenta que los ovocitos inmaduros pueden tener presente la vesícula germinal (VG),

rompimiento de la vesícula germinal (RVG) o cromosomas en Metafase I (MI). En los ovocitos maduros se pueden observar los cromosomas en metafase II (MII) y hay presencia del primer cuerpo polar. (Rao, 2002)

2.5.2. Evaluación morfológica de la maduración de los ovocitos ovinos

El ovocito maduro tiene una morfología y características definidas, generalmente aceptadas como criterios para evaluar la maduración in vitro. De este modo, consideramos maduros a aquellos ovocitos que presentan cúmulus mucificado y expandido, presencia del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino y metafase II. A pesar de ello, la capacidad de los ovocitos para ser fertilizados in vitro y continuar el desarrollo normal de los embriones, es probablemente el criterio más adecuado. (De Loos *et al.*, 1992)

- a) La calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito y la apariencia del citoplasma, son los mejores indicadores del potencial que este posee para la maduración y fertilización in vitro.

Por lo tanto se evaluó el grado de expansión y elasticidad de las células del cúmulus de la siguiente manera:

- Grado I (+) de expansión y elasticidad del cúmulus, se aprecian células sin elasticidad ni expansión.
- Grado II (++) de expansión y elasticidad del cúmulus, donde las células del cúmulus se aprecian con ligera expansión y elasticidad.

- Grado III (+++) de expansión y elasticidad del cúmulus, donde las células del cúmulus se aprecian con máxima expansión y elasticidad, considerándolos maduros.
- b) Los ovocitos madurados *in vitro* sufren por un lado un retraso en la migración de los gránulos corticales a la periferie del ovocito y presencia de un mayor número de prolongaciones celulares, provenientes de las células de la corona radiada en el espacio perivitelino, lo cual nos hace considerar a la aparición del espacio perivitelino como un criterio para evaluar el grado de maduración citoplasmática de los ovocitos. (De Loos *et al.*, 1992)

2.6. MEDIOS DE CULTIVO

Varios medios de cultivo con bicarbonato o HEPES y suplementados con suero fetal bovino, gonadotropinas y/o esteroides, han sido ampliamente usados para estudiar la maduración *in vitro*. Las condiciones de cultivo durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos pueden influir significativamente sobre la tasa de fecundación *In vitro* y el subsecuente desarrollo embrionario. (Palomares, 2006)

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos ovinos se utilizaron diferentes medios de cultivo (Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1). Todos ellos presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador. En dichos medios, los componentes varían

en diferentes proporciones. A pesar de la amplia variedad de medios descrita, el más utilizado es el TCM- 199. (Gliedt *et al.*, 1996)

2.6.1. Suplementación del medio de cultivo

El medio de maduración de los ovocitos, es suplementado con suero fetal ovino (SFO), suero de oveja en época no reproductiva o albúmina sérica ovina (OSA). Estos elementos, favorecen la expansión de las células del cúmulus y la producción de factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa. (Lee *et al.*, 1996)

Las hormonas FSH y LH desempeñan un papel importante en los procesos de maduración *in vivo* y son utilizadas para la maduración *in vitro*. También se presentan, estrógenos, progesterona y hCG, que son diferentes suplementos comúnmente utilizados en los medios de cultivo y tienen acción positiva en la maduración *in vitro* de ovocitos. (First y Parrish, 1988)

En el estudio realizado por Stubbings *et al.* (1988) se determina la importancia de la adición al medio de cultivo (TCM-199) de diferentes concentraciones de hormonas FSH, LH, estrógenos y suplementos como SFB e insulina. Los resultados obtenidos, demuestran que la adición de estrógenos favorece las tasas de maduración *in vitro* en comparación al aporte de FSH, LH o insulina. (Stubbings *et al.*, 1988)

2.6.2. Suero Sanguíneo de oveja en época no reproductiva

a. Rol de los progestágenos

La progesterona es el progestágeno natural más abundante durante la gestación y es secretada por células lúteas del cuerpo lúteo, la placenta y la glándula suprarrenal.

Es transportada en la sangre por una globulina de enlace y su secreción es estimulada principalmente por la hormona luteinizante (LH) (Hafez *et al.*, 2002). En la oveja, las concentraciones plasmáticas de progesterona comienzan a elevarse a 2 a 4 ng/ml aproximadamente a los 10 días post fecundación, permaneciendo constantes hasta el día 80 y volver a aumentar de manera exponencial, llegando a sus máximas concentraciones de entre 12 a 14 ng/ml el día 140 de gestación, para luego ir declinando en la sangre materna entre 5 y 15 días antes del parto. (Ryan *et al.*, 1999)

En la oveja, la fuente de progesterona durante la primera mitad de la gestación (días 50-60) está a cargo del cuerpo lúteo y posteriormente la placenta pasa a ser su fuente principal. Algunas de sus funciones son:

- Suprimir la reiniciación de la actividad cíclica.
- Preparar el endometrio para la implantación del embrión y el mantenimiento de la preñez.
- Aumentar la actividad de las glándulas secretoras endometriales (etapa histotrófica de la nutrición del embrión).
- Mantener la inactividad del miometrio durante la preñez, al inhibir la síntesis de los receptores para los agonistas estrogénicos, suprimiendo la síntesis de prostaglandinas, inhibiendo la

liberación de oxitocina por la neurohipófisis y reduciendo la disponibilidad del calcio intracelular.

- Provocar el desarrollo de los alvéolos de la glándula mamaria. (Ryan *et al.*, 1999).

b. Rol de los estrógenos

El estradiol es el estrógeno biológicamente activo producido por el ovario, junto con cantidades menores de estrona y estriol (Hafez *et al.*, 2002). El sitio principal de la biosíntesis de los estrógenos en la gestación es la placenta, gracias a la acción del cortisol fetal, pudiendo convertir esteroides de C27 (colesterol) a estrógenos y de otras fuentes de precursores, como la androstenadiona y testosterona de la adrenal fetal, debido al aumento de las actividades de las enzimas aromatasas y esteroide sulfatasa en la placenta. La concentración de 17β -estradiol en el plasma materno es baja durante la gestación y se eleva sólo 24 horas antes del parto. Las acciones fisiológicas del estradiol durante la gestación son:

- Estimular la actividad miométrica, al incrementar la sensibilidad a los agonistas estrogénicos y aumentar la propagación de la contracción del miometrio.
- Modular a nivel del hipotálamo la expresión del gen para oxitocina.
- Inducir hiperemia y edema del aparato genital de la hembra.
- Relajar la articulación sacroilíaca y los ligamentos del cinturón pelviano.

- Aumentar el tamaño de la glándula mamaria, estimulando el crecimiento de los conductos y el pezón. Los estrógenos también actúan en el útero incrementando las masas endometrial y miometrial e incrementando la amplitud y frecuencia de las contracciones mediante la potenciación de los efectos de la oxitocina y la prostaglandina F2 α (Hafez *et al.*, 2002).

En conjunto, la progesterona y los estrógenos deben asegurar que la irrigación sea adecuada a nivel placentario, promoviendo el crecimiento y el grado de dilatación de los vasos sanguíneos a lo largo de la gestación. (Ryan *et al.*, 1999)

2.6.3. Antecedentes

a) **Antecedentes de superovulación u ovulación múltiple en ovinos.**

La superovulación es necesaria en programas de transferencia de embriones para acelerar la propagación de animales con alto valor genético para algún rasgo deseable (Abd-Allah *et al.*, 2013) El tratamiento con gonadotropinas, ya sea hormona folículo estimulante (FSH) o gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) provoca el desarrollo de varios folículos, posteriormente la ovulación y consecuentemente la formación de cuerpos lúteos (Grazul-Bilska *et al.*, 2017).

El objetivo de los tratamientos de superovulación en las ovejas es la obtención de un máximo número de embriones transferibles, con una alta probabilidad de producir gestaciones (Armstrong, 1993). Los protocolos de superovulación permiten utilizar las ovejas a su máximo

potencial y tomar ventaja de la gestación relativamente corta (Gonzales-Bulnes *et al.*, 2010)

b) Antecedentes de superovulación

Las primeras descripciones de superovulación fueron registradas por Smith y Engle en 1927, quienes utilizaron preparados crudos de pituitaria para inducir un incremento en la tasa de ovulación de ratones y ratas (Gordon, 2015). En 1930, Cole y Hart, descubrieron que si inyectan suero de yeguas gestantes en animales de laboratorio, se estimula el crecimiento ovárico. El componente activo de este suero fue nombrado gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG). Consecuentemente se estudiaron las hormonas de la pituitaria y el efecto superovulatorio que tenían (León *et al.*, 2008); no obstante, la superovulación se extendió hace casi 55 años y se ha aplicado en la investigación ovina y su producción. (Gordon, 2005)

Los protocolos de superovulación han evolucionado mucho en los últimos 40 o 50 años (Boscos, 2002). En los últimos 35 años, los investigadores han utilizado distintas hormonas, tales como la gonadotropina corionica equina (eCG), la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, la inmunización contra inhibina y hormona folículo estimulante equina (eFSH), para inducir la superovulación (Fernández, 1993). Quirke *et. al.* (1962) realizaron investigación en ovejas en anestro en un intento por obtener información referente al efecto de aplicar diferentes niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) en la incidencia del estro y la ovulación.

2.6.4. Fertilización de ovocitos Ovinos

Se denomina fertilización a la serie de eventos que ocurren entre los espermatozoides y el ovocitos, que dan por resultado la fusión de gametos formándose un pro núcleo femenino y otro masculino que se fusionan dando por resultado la formación de un cigoto (IRAC, 2004).

2.7. PREPARACIÓN DEL SEMEN

En mayor medida, el semen de ovino utilizado para la fertilización in vitro procede de semen congelado. La preparación del semen congelado de ovino, incluye el lavado de las células espermáticas de los componentes del diluyente y crio protectores, la separación de los espermatozoides motiles de los no mótiles y la capacitación espermática. (Risopatrón *et al.*, 1996)

a) Lavado del semen y separación de espermatozoides motiles y no motiles

Al menos cinco metodologías han sido descritas para la separación de los componentes del diluyente seminal de las células espermáticas y su selección. Estas son: lavado por centrifugación, swim-up, gradiente de percoll, filtración en columna con lana de vidrio y migración-sedimentación. El lavado por centrifugación resulta ser el método más sencillo de todos. El semen se centrifuga 2 veces a 500G durante 5 a 10 minutos (Risopatrón *et al.*, 1996).

b) Capacitación de los espermatozoides

La capacitación espermática involucra cambios bioquímicos en las membranas del espermatozoide, lo que permite la reacción acrosómica. Durante éste proceso, se produce el retiro del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide dejando libres los receptores que interaccionan con las células del cúmulus y la zona pelúcida del ovocito. Del mismo modo, se han descrito cambios en las propiedades de las membranas espermáticas: aumento del pH acrosomal, alteración en la proporción entre el colesterol y fosfolípidos y aumento en la permeabilidad al calcio. (Yanagimachi, 1981)

Para la capacitación de semen congelado de ovino, se emplean componentes como la heparina, el calcio, células del epitelio oviductal, fosfolípidos vaso activos. La heparina, capacita a las células espermáticas, mediante el desplazamiento de las proteínas decapacitantes de la membrana plasmática y la estimulación de la apertura de los canales de calcio. (Saeki *et al.*, 1995)

2.8. FERTILIZACIÓN IN VITRO DE LOS OVOCITOS

Finalizado el periodo de incubación in vitro, los ovocitos madurados se encuentran aptos para ser fertilizados in vitro. Tanto para condición in vivo como in vitro, previo a la fertilización de los ovocitos, el semen debe estar capacitado y activado. La capacitación y activación del espermatozoide, posibilitará a este progresar a través de las células del cúmulus y penetrar la zona pelúcida. (Yanagimachi, 1981)

2.8.1. Evaluación morfológica de la fertilización

En general, se considera fertilizado a aquel ovocito que ha emitido el segundo corpúsculo polar y se visualizan los pronúcleos masculino y femenino y la cola espermática (Del Campo, 1993). Sin embargo, no siempre es posible la visualización de todas las estructuras y se propone la formación de las primeras blastómeras como criterio (Fukui, 1990).

2.8.2. Medios empleados y tiempo de fertilización

De acuerdo al trabajo de revisión realizado por Brackett y Zuelke (1993), la mayoría de las experiencias llevadas a cabo en fertilización in vitro, utilizaron básicamente los medios Tyrode's Albúmina-Lactato-Piruvato (TALP) y Brackett and Oliphant (BO) para el lavado y capacitación del semen. A su vez, la fertilización los ovocitos puede realizarse en un periodo de tiempo corto (6 a 8 h) o bien, un tiempo largo (18 a 24 h.).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, el cual se encuentra ubicado en la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, la ubicación geográfica es de 15°49'53" latitud sur y longitud oeste 70°01'55" a 3824 m.s.n.m. (SENAMHI, 2012)

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

a. Ovocitos de ovinos (*Ovis aries*)

Los ovocitos de ovino fueron obtenidos a través del método de aspiración folicular de los ovarios extraídos inmediatamente después del beneficio de ovinos, de distintas razas, distintas edades y en distintos estados fisiológicos, en el camal Municipal de la Provincia de Ilave.

b. Distribución del material experimental

TABLA 1: Distribución de los de ovocitos de ovinos para su maduración dentro de tratamientos con TCM (medio de cultivo tisular) y la adición de suero de ovino (10%)

	Grupo Experimental	Grupo Control
Tratamientos	TCM-199 + Suero de oveja Superovulada	TCM-199 + Suero Oveja en época no reproductiva
Repeticiones		
R1	15 ovocitos	15 ovocitos
R2	15 ovocitos	15 ovocitos
R3	15 ovocitos	15 ovocitos
R4	15 ovocitos	15 ovocitos
R5	15 ovocitos	15 ovocitos
Total	75 ovocitos	75 ovocitos

R: Placa Petri con N número de ovocitos

Factor de inclusión: se utilizan ovocitos de categoría A y B.

Factor de exclusión: se excluirán ovocitos de categorías C y D.

Tabla 2: Distribución de ovocitos de ovinos madurados, utilizados para la fertilización con el medio de fertilización y la adición suero de ovino. (10%)

	Grupo Experimental	Grupo Control
Tratamientos Repeticiones	TCM-199 + Suero de oveja Superovulada	TCM-199 + Suero Oveja en época no reproductiva
R1	15 ovocitos	15 ovocitos
R2	15 ovocitos	15 ovocitos
R3	15 ovocitos	15 ovocitos
R4	15 ovocitos	15 ovocitos
R5	15 ovocitos	15 ovocitos
Total	75 ovocitos	75 Ovocitos

R: Placa Petri con N número de ovocitos

Factor de inclusión: se utilizan ovocitos de categoría A y B.

Factor de exclusión: se excluirán ovocitos de categorías C y D.

3.3. METODOLOGÍA

a. Recolección de ovarios y ovocitos

1. Los ovarios de ovejas sacrificadas fueron recolectados en bolsas de polietileno que contenían solución salina (0.9% NaCl) + antibióticos (100 UI/mL de penicilina + 1 mg de estreptomicina), dentro de un termo con agua caliente a 30 - 35°C y transportados al laboratorio.
2. En el laboratorio se lavaron los ovarios con suero fisiológico a una temperatura de 35°C fijándolos con una pinza de enterectomía, y secados cuidadosamente con papel toalla.

3. La aspiración de los ovocitos se realizó por punción de los folículos de 1 a 5mm con ayuda de una aguja 18G X 1", adosado a una jeringa de 5 mL y con una presión de 11 mL/ min (velocidad del embolo de la jeringa).
4. Se depositó el contenido de la aspiración (fluido folicular + ovocitos) a un tubo falcon de 10 mL de capacidad, el cual estuvo en baño maría a 37°C, para luego dejarlo en reposo por 10 min.
5. Seguidamente se extrajo el sobrenadante con una jeringa de 10 mL.
6. El sedimento se vertió a la placa Petri (35 x 10 mm), que previamente se cuadriculó en su base y contenía 2 mL de m-PBS y luego se procedió a la búsqueda de ovocitos en el microscopio estereoscopio a un aumento de 25X.
7. Finalmente se aspiraron los ovocitos con ayuda de un tip adosado a una jeringa de tuberculina cuidadosamente, para ser trasladados a otra placa Petri que contenía 3 mL de m-PBS y se realizó la evaluación y selección de ovocitos.

b. Evaluación y selección de ovocitos

Se evaluaron los ovocitos en la placa Petri, con ayuda de un microscopio estereoscopio a un aumento de 25X en el cual se categorizaron de acuerdo al número de capas de células del cúmulus y la apariencia del citoplasma, la categorización empleada fue de acuerdo a la recomendación de Leibfried y First (1979).

3.4. MADURACIÓN DE OVOCITOS

a. Equilibrio del Medio de Maduración

- 1.- Primero se elaboró el medio de maduración TCM-199 con sus respectivas sustancias en diferentes cantidades (**Tabla 6 Anexo A-1**). A este medio se le determinó el pH.
- 2.- Para equilibrar el pH se adecuó una bomba de CO₂ que consistió en un envase plástico del cual se extrajo totalmente el aire dejando en su interior 20 mg de bicarbonato, seguidamente se selló con una tapa acoplada a una válvula y una pinza, por medio de la válvula se introdujeron 10 mL de agua destilada en el interior del contenedor, esto ocasionó la liberación de CO₂ en el interior del contenedor, de esta manera obtuvimos una bomba de CO₂.
- 3.- Dentro de la incubadora se colocó una placa Petri de 35 x 10 mm, con 6 gotas de aproximadamente 50uL de medio de maduración TCM – 199 que contenía los distintos Sueros fisiológicos (SOENR) y (SOSO) Cubiertos con 3.5 ml de aceite mineral. Los componentes en sus respectivas cantidades se detallan en la **tabla 6 del Anexo A-1**
- 4.- El medio de maduración fue equilibrado a una temperatura de 38.5 °C durante 2 horas a una temperatura de 38°C con un 5% de CO₂.

b. Maduración de ovocitos

1. Se lavaron los ovocitos obtenidos anteriormente en un medio que fue mezcla de PBS + 10% BSA. (**Tabla 5 Anexo A-1**)
2. Seguidamente se colocaron de en promedio 15 ovocitos seleccionados de categoría A y B en el medio de maduración TCM-199 previamente equilibrado.
3. Finalmente se incorporaron las placas dentro de la cámara de incubación durante 24 h a una temperatura de 38.5 °C, una saturación de CO₂ de 5% y una humedad del 90%.

c. Evaluación de la maduración

Pasadas las 24 h de maduración los ovocitos fueron retirados de la incubadora y depositados en un tubo de ensayo con 0.5 mL de PBS + 10% SFB (**Tabla 5 Anexo A-1**) posteriormente fueron homogenizados 4000 rpm por 3 min.

La maduración ocurrió por las siguientes características:

Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II.

- Expansión del cumulo celular.
- Visco-elasticidad del Cúmulus Ophorus. (De Loos *et al.*, 1992)

3.5. FERTILIZACIÓN DE LOS OVOCITOS

a. Equilibrio del medio de fertilización

Medios Stock

Los medios Fert talp (**Tabla 7 Anexo A-1**) y Sperm talp (**Tabla 8 Anexo A-1**), se prepararon en 100ml de agua ultra pura cada uno, se filtró, se determinó el pH y se envaso por 3 semanas en frascos de 5ml hasta su uso correspondiente. (A estos medios se les conoce como medios de trabajo)

Soluciones de trabajo

1. Se preparó 2 tubos de 10 ml de capacidad, el primero con 5ml de la solución **Fert Talp (Tabla 7 Anexo A-1)** y el segundo con **Sperm Talp (Tabla 8 Anexo A-1)**
2. Se procedió a medir el pH de cada tubo A y B.
3. El primer tubo (Fert Talp), con ayuda de la bomba de CO₂, se equilibró a 7.1 de pH, con esta solución, se hizo una placa con 6 gotas, esta placa se llevó a la incubadora por 2 horas Junto al tubo de la solución de Sperm talp (B).
4. Al Segundo tubo (Sperm Talp) (**Tabla 8 Anexo A-1**), pasada 1 hora desde el ingreso a la incubadora junto a la placa de la solución A, con ayuda de la bomba de CO₂, se le equilibró el pH a 7.1, de aquí sacamos 1ml de la solución y lo llevamos a otro tubo de ensayo limpio.

5. Al colocar las placas en la incubadora se les cubrió con 10 ml de aceite mineral, previamente equilibrado (Para tal efecto se mantuvo el aceite en la incubadora durante todo el tiempo con la tapa suelta)
6. Se colocó las placas en la incubadora por 2 horas antes de colocar los COC para que se equilibren (temperatura y atmosfera de gases).
7. Se colocó los ovocitos previamente lavados y desnudos sin su cúmulus y en número de aproximadamente 10 ovocitos madurados por gota y se devolvió a la incubadora tan pronto fue posible.
8. Se colocó dentro de la gota 2 uL de (Penicilamina/ Hipotaurina/ Epinefrina, PHE), 2 uL de Heparina (en la concentración adecuada, generalmente 2 a 5 ug/ml) y finalmente 2 uL de la solución con los espermatozoides previamente preparados (en la concentración adecuada, generalmente 1×10^6 espermatozoides/ml)

b. Preparación del semen y fertilización in vitro

Para la fertilización *in vitro* se utilizó semen descongelado de carnero, debe tenerse cuidado al preparar los espermatozoides para la fertilización *in vitro*. Existen variados procedimientos para la preparación del semen, sin embargo el más común es el método de **SWIM-UP**; que consiste en:

1. Primeramente, se extrajo la pajilla de 0.5mL del tanque criogénico y se realizó la descongelación sumergiéndola en baño maría a 37°C por 30 segundos con ayuda de una pinza larga, seguidamente esta pajilla se secó y cortó en el extremo sellado con el alcohol polivinílico.
2. La totalidad del contenido de la pajilla (semen) fue vertido a un tubo de ensayo precalentado y protegido dentro de un baño maría a 37°C, seguidamente en el microscopio se realizó la evaluación de la motilidad total.
3. Se mezcló semen descongelado en 1mL de la solución de Sperm talp (B) por 1 hora, esta técnica “Swim up” hace que se seleccionen los mejores espermatozoides. (Flotación).
4. Pasada 1 hora se retiró las 2/3 partes del sobrenadante a un tubo vacío, se descartó el resto del fondo del tubo.
5. Se centrifugo a 1000 RPM x 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó lo que quedaba en el fondo del tubo. Evaluamos la motilidad.

c. Fertilización *in vitro*

1. Un tercer tubo que contenía 1 ml de Fert talp (A), + 2 ml de heparina, se vertió en el tubo que contenía los espermatozoides que quedaron en el fondo de la centrifugación anterior, se mezcló y fue llevado nuevamente a la incubadora para su respectiva capacitación por 15 minutos.

2. Se evaluó la motilidad progresiva y se fertilizaron los ovocitos maduros con una micro pipeta graduada.
3. Simultáneamente antes de fertilizar los ovocitos se evaluaron y prepararon de la siguiente manera:
 - En un primer tubo se prepararon 10ml de solución PBS + 10%.
(Tabla 5 Anexo A-1)

De esta solución se sacó 1ml a un segundo tubo.

- A este segundo tubo con 1ml de la anterior solución se le pusieron los ovocitos maduros con su cúmulus Ophorus y se vortizó por 3 minutos a 4000rpm.
- Se recolectaron los ovocitos en una placa cuadrículada con 2ml de solución PBS, de ahí con ayuda de un tip adosado a la micro pipeta los ovocitos fueron puestos en la placa que contenía las gotas de Fert talp **(Tabla 7 Anexo A-1)** que estuvieron 2 horas en la incubadora.
- Finalmente se juntaron los espermatozoides capacitados en el Fert Talp + Heparina en la placa de fertilización que contenían los ovocitos madurados, esta placa regreso lo más rápido posible a la incubadora.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada una de las variables de estudio (maduración y fertilización).

El análisis estadístico se realizó mediante el método estadístico, Prueba de CHI CUADRADO donde se tiene la siguiente formula:

$$x^2(df) = \sum \frac{(fo - ft)^2}{ft}$$

Dónde:

x^2 : Chi Cuadrada

df : Grados de libertad

\sum : Sumatoria de...

fo : Eventos observados

ft : Eventos esperados

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MADURACIÓN *in vitro* DE OVOCITOS OVINOS

La tabla 1 muestra los resultados de ovocitos madurados con los diferentes sueros sanguíneos de oveja, adicionado al medio de cultivo tisular (TCM-199), donde a la evaluación morfológica de los ovocitos, encontramos que el grupo control TCM+SOENR (suero de oveja en época no reproductiva), (**Tabla 9 Anexo A-1**), muestra una tasa de maduración del **85.14%**, en el tratamiento con TCM+SOSO (suero de oveja súper Ovulada) (**Tabla 10 Anexo A-1**) un **94.34%**, presentando una similitud entre el grupo control y el grupo experimental.

Tabla 3: Porcentaje de maduración de ovocitos ovinos por tratamientos a las 24 horas.

GRUPOS	N	Expansión de células del Cúmulo	Presencia de corpúsculo polar	Presencia de espacio Perivitelino	Maduración ovocitaria
TCM-199 + Suero Oveja Superovulada	75 ovocitos	+++	38.71%	55.63%	94.34%
TCM-199 + Suero de oveja en época no reproductiva	75 ovocitos	+++	30.98%	54.16%	85.14%

Estos resultados similares se deberían a que la presencia del suero de oveja superovulada influye dentro de la fisiología reproductiva, por las concentraciones de proteínas, esteroides, carbohidratos y mucopolisacaridos (Gibory y Millar, 1982). Pero el suero de oveja en época no reproductiva presenta un menor porcentaje de *estradiol*, proteínas y esteroides y mucopolisacaridos. (Jabbour y Evans, 1991)

El suero sanguíneo utilizado como suplemento de los medios de maduración es una combinación altamente compleja de componentes que incluye proteínas, ácidos grasos, vitaminas, hormonas, elementos traza y factores de crecimiento. La suplementación de los medios de maduración con suero se ha utilizado de forma rutinaria en los sistemas de MIV para proporcionar una fuente de proteínas y energía al ovocito durante la maduración. También se ha considerado la importancia de incluir suero en el medio de MIV para prevenir el endurecimiento de la zona pelúcida ya que esto podría afectar de forma adversa la fecundación. (Universidad de Cataluña, 2005)

De esta manera, la razón por la que los ovocitos madurados con ambos sueros (suero de oveja en época no reproductiva y suero de oveja Superovulada), tengan una similitud en su maduración, puede deberse a que en el suero de oveja Superovulada se encuentran niveles más altos de factores de crecimiento, evidenciado al encontrar a nivel uterino receptores para el factor de crecimiento epidermal en el endometrio, al igual que en la placenta humana, lo que nos evidencia la presencia de este tipo de factores (Gaviria, 2000), además de la presencia del mismo en líquido amniótico y plasma materno (Knobil, 1993). Estos factores de crecimiento no solo están presentes en el fluido folicular y en los antes mencionados sino también en el suero que también contiene otros factores de crecimiento De acuerdo con palomares 2006, que indican que algunos factores de crecimiento y citoquinas, actúan como reguladores intra ovaricos a nivel folicular, estos tienen acción moduladora sobre las gonadotropinas que actúan de forma autocrina y paracrina. El EGF (Factor Crecimiento Epidermal) ha sido encontrado en folículos antrales y preantrales pequeños de hámster. Este factor de

crecimiento estimula la síntesis de ADN y la proliferación de células de la granulosa e inhibe su diferenciación, también acorta el tiempo requerido para la ruptura de la vesícula germinal, promoviendo la reanudación de la mitosis, que con la suplementación del medio de cultivo, con hormonas como la FSH, LH y estrógenos, crean un ambiente similar al *in vivo* que reafirma lo que demuestran estudios, que el medio de maduración suplementado con hormonas gonadotrópicas, mantienen la vesícula germinal intacta y la subsecuente fertilización efectiva, comparado con el medio TCM-199 sin suplementos. (Ocaña, Quero *et al.* 1997)

A diferencia de los resultados encontrados por McDonald's. (2003), que empleo el líquido folicular bovino como aditivo en el medio de desarrollo, sin obtener un efecto beneficioso sobre la tasa de desarrollo y de Berg and Brem (1989), cuando dicen que el medio de TCM -199 puede ser utilizado tanto para maduración como para cultivo, frecuentemente sin otro medio. Cuando el medio fue suplementado con suero de oveja superovulada se piensa que, este solo aumentaría los niveles de estrógenos y LH, siendo esta composición, insuficiente para la maduración exitosa de los ovocitos. Indicando así que sería importante conocer la totalidad de los componentes que contiene este suero y su función específica en el mismo, para la realización de futuros proyectos de investigación sobre maduración ovocitaria con el fin de estandarizar las técnicas utilizadas y demostrar su funcionamiento real, logrando así, un incremento en las tasas de MIV.

Similares hallazgos han sido reportados por Zhang y col (2008) donde encontraron que el número de células que rodean el ovocito (factor importante para la clasificación de la calidad de los ovocitos) juega un papel importante en

el desarrollo, ya que estas establecen una verdadera cooperación metabólica posibilitando el pasaje de nutrientes hacia el ovocito. (Buxade. 2008)

Los resultados del presente trabajo son superiores, comparados con los resultados de Rao *et al.* (2002), que utilizando una concentración de TCM199 + SFB 10% + FSH 5µg/mL + LH 5µg/mL + Gentamicina 30 µg/mL. en un medio de maduración TCM-199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 0.3 mM de piruvato, obtuvo una maduración de 58%, esto se debería a que en el medio empleado en el presente estudio (TCM-199 + 10% suero oveja superovulada) contenía mayor cantidad de antibiótico (Gentamicina 50 µg/mL.) causando menor proliferación de microorganismos que pudieron contaminar el medio.

También los resultados obtenidos en el presente trabajo son superiores a los resultados reportados por Ledda *et al.* (2001), quien obtuvo una maduración del 83-87%%, esto lo podemos atribuir a que el autor trabajó con un medio de cultivo suplementado con TCM-199 + FCS 10% + FSH 0.1 UI/mL + LH 0.1 UI/mL, usando cantidades hormonales menores al presente trabajo, (TCM 199 suplementado con 10% de Suero Fetal ovino (SFO) inactivado por calor, 0.3 mM de piruvato, y Penicilina 100 UI/mL, FSH 10UI Y LH 10UI, Estreptomina 100 mg/mL) de la misma manera el autor utilizó Suero Fetal Bovino, que como ya se estudió carece de los compuestos que existen en el suero de oveja Súper ovulada que fue utilizado en el presente estudio.

Así mismo los resultados obtenidos en la presente investigación fueron similares a los resultados citados por Wahid *et al.* (1992), quien también utilizó 10 mg/mL de FSH-LH, suplementado con 10% de suero fetal bovino, llegando a madurar un 82% de ovocitos, estos resultados similares lo podemos atribuir

a que en el presente trabajo también se utilizó cantidades similares de las hormonas LH-FSH. (10 mg/mL)

Por otra parte Guler et al (1998), al utilizar TCM199 + IGF-I 100 ng/mL + FSH 100 ng/mL, obtuvieron el 87% de maduración, siendo este porcentaje similar al obtenido en el presente trabajo, esto lo podemos atribuir a las hormonas esteroides, gonadotropinas y factores de crecimiento, incluyendo el Factor de Crecimiento Insulinico (IGF), contenidos en el líquido folicular. (Moor y col. 1985)

Una elevada proporción de ovocitos degenerados y la baja proporción en la maduración obtenida por los anteriores autores pudo deberse a la ausencia en el medio de maduración de factores de crecimiento, ya que el medio de maduración contenía fuentes energéticas como el piruvato y la glucosa. (Moor y col. 1985)

En tanto que O'Brien *et al.* (1996), obtuvieron 100% de ovocitos madurados al utilizar 10 mg/mL de FSH y 10 mg/mL de LH, además de adicionar 0.3 mM de Piruvato, 0.3 mM de Glutamina y 1mg/mL de Estradiol, estos resultados son similares al presente trabajo puesto que al adicionar 1mg/mL de estradiol, este actuó como el suero de oveja superovulada que utilizamos en nuestro trabajo ya que el estradiol que se encuentra en el suero de oveja súper ovulada ayuda mucho en la maduración de los ovocitos, puesto que la superovulación aumenta la producción de estradiol preovulatorio. (Jabbour y Evans, 1991; Driancourt y Fry, 1992; Murray y col., 1994)

Posteriormente, el estudio de Driancourt y Fry (1992) demostró que los folículos individuales obtenidos a partir de animales tratados con GnRH, (ovejas superovuladas), si bien tienen similar cantidad de células de la

granulosa, secretan más estradiol en cultivo que aquellos provenientes de ovejas no tratadas (ovejas en época no reproductiva); lo cual nos indica que existe un mayor porcentaje de estradiol disponible para la maduración ovocitaria en el suero de ovejas superovuladas contribuyendo a su vez lograr una alta tasa de fertilización *in vitro*. (Watanabe y col., 1998)

Fertilización in vitro de ovocitos ovinos

En la tabla 2 se observa los resultados obtenidos, de ovocitos madurados en los medios con distintos tipos de suero (SOSO) y (SOENR).

Tabla 4: Porcentaje de fertilización in vitro de ovocitos ovinos madurados en diferentes medios.

TRATAMIENTOS	TCM-199 + Suero Oveja Superovulada	TCM-199 + Suero de oveja en época no reproductiva
PORCENTAJE %	61.45%	68.25%

Los resultados del trabajo muestran que el suero de oveja en época no reproductiva mostro una tasa de fertilización de 68.25% y el suero de oveja superovulada muestra una tasa de fertilización de 61.45% .

Se obtuvo un porcentaje de FIV con suero de oveja superovulada de 61.45%, superior al 52% reportado por Morris *et al.* (2003), y similar a lo obtenido por Mossa *et al.* (2008) y Shirazi *et al.* (2009) 72% y 74% respectivamente, pero inferior al 80% (Hollinshead *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2009) y 82% (Accardo *et al.*, 2004; Leoni *et al.*, 2007). Para llevar a cabo con éxito la FIV es importante el medio utilizado (Wani, 2002). En el presente estudio se utilizó el medio TCM-199, con resultados comparables a los que se han obtenido con el medio SOF:

72% (Mossa et al., 2008) y 74% (Shirazi *et al.*, 2009); el SOF es el medio que generalmente se utiliza para FIV en ovinos.

Estos resultados muestran claramente que el tratamiento 2 con TCM-199 + Suero de Oveja superovulada, fue menor con una tasa de fertilización de 61.45% a la suplementación del 10% de Suero de oveja en época no reproductiva con 68.25% encontrándose diferencia estadística entre ambos grupos. Esto lo podemos atribuir a la ausencia de pantotenato en el medio TCM-199, vitamina hidrosoluble esencial para la biosíntesis de coenzima A, la cual es un cofactor para una cantidad importante de reacciones enzimáticas incluyendo la oxidación de los ácidos grasos, piruvato, lactato y aminoácidos; nutrientes indispensables para el cultivo de células, incluyendo los embriones. (McKiernan y Bavister, 2000)

Los resultados obtenidos en la presente investigación son superiores frente a los obtenidos por Navarro (2006), que utilizando el medio HECM-9 de maduración, obtuvo un 25% de fertilización, este resultado también fue superior a su trabajo realizado en el medio de maduración TCM-199 con un 6% de fertilización. Esta diferencia pueden ser atribuida a la presencia de suero de oveja superovulada que contiene sustancias favorecen la maduración y posterior fertilización como el estradiol, además del adiconamiento de piruvato de sodio, a su vez en el trabajo del autor el medio HECM-9 contiene pantotenato (no contenida en el TCM-199), vitamina hidrosoluble esencial para la biosíntesis de coenzima A, la cual es un cofactor para una cantidad importante de reacciones enzimáticas incluyendo la oxidación de los ácidos grasos, piruvato, lactato y aminoácidos; nutrientes indispensables para el cultivo de células, incluyendo los embriones. (McKiernan y Bavister, 2000)

Shirazi *et al.*, (2009) obtuvo 74% de fertilización en el medio SOF, estos resultados son superiores a los resultados del presente trabajo, ya que el medio SOF (Fluido oviductal sintético) es el medio que generalmente se utiliza para FIV en ovinos, ya que este medio es formulado a base de iones, azúcares y aminoácidos que simulen el ambiente uterino y oviductal en el momento de la liberación del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario. (Mejía, 2009)

Nagar y Purohit (2005), observaron una tasa de fertilización de ovocitos de cabra madurados y fertilizados en TCM-199 de 9.3%, encontrando además que la adición creciente de EGF (Factor de crecimiento epidérmico) incremento significativamente la tasa de FIV. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son superiores en ambos tratamientos (61.45%) (68.25%), estos autores sugieren que el TCM-199, por sí solo no es adecuado para soportar el proceso de FIV y que requiere de sustancias adicionales como el EGF (factor de crecimiento epidermal que faciliten el proceso de la fecundación, En este caso el suero sanguíneo es mucho mejor como sustancia adicional que el EGF (Factor de crecimiento epidérmico). (Gall *et al.*, 2005).

V. CONCLUSIONES

- Con el medio de maduración TCM-199 + Suero de oveja súper ovulada, se obtuvo una maduración ovocitaria del 94.34%, y con el medio TCM + suero de oveja en época no reproductiva una maduración de 85.14%, no hubo diferencia entre ambos tratamientos
- Con el suero de oveja súper ovulada, se obtuvo una fertilización de 61.45%, y con el suero de oveja en época no reproductiva se obtuvieron unos resultados de 68.25% de fertilización, no mostrando así diferencia entre ambos grupos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar el suero de oveja súper ovulada para la suplementación de los medios de maduración *in vitro*. No se recomienda utilizar el suero de oveja súper ovulada para la suplementación de los medios de fertilización *in vitro*.
- Es importante realizar investigaciones sobre la composición del Suero de oveja Superovulada, para incrementar información sobre la formulación de medios de cultivo de los gametos.
- Se recomienda llevar las muestras extraídas de los animales beneficiados lo más rápido posible hasta el laboratorio para obtener mejores resultados.

VII. REFERENCIAS

- Abd-Allah, S. M., R. K. Sharma, S. K. Phulia. And S. Inderjeet. (2013).
Superovulatory Response Following Transvaginal Follicle Ablation in
Murrah Buffalo: Effect of FSH or PMSG + FSH. *Theriogenology Insight*:
3ra edición, 77-84.
- Accardo, C., Dattena, M., Pilichi, S., Mara, L., Chessa, B., Cappai, P. (2004).
Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep
oocytes; embryo development and viability. *Anim. Reprod. Sci.* 81: 77-
86.
- Armstrong, D. T. (1993). Recent advances in Superovulation of cattle.
Theriogenology 39: 7-24.
- Alencastre, (1997), Producción de ovinos, primera edición, Puno Perú.
- Ali, A. y Sirard, M.A. (2002): Effect of the absence or presence of various
protein supplements on further development of bovine oocytes during In
vitro Maturation. pgs 901-905.
- Arroyo, L. (2006). Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo
reproductivo anual de la oveja: una revisión. Caracas Venezuela. INCI,
Vol 31, No. 1. Pag. 8-15.
- Aisen E. (2004) reproducción ovina y caprina 14 16 argentina editorial
intermedia.
- Boscós, C.M., Samartizi, F.C., Dellis, S., Rogge, A., Stefanakis, A. Krambovitis,
E. (2002). Use of progestagen-gonadotropin treatments of sheep.
Theriogenology 58,1261-1272.
- Brackett, B.; Zuelke, K. (1993). Analysis of factors involved in the in vitro
production of bovine embryos. *Theriogenology*: pgs: 43-64.

- Buxade, C. (1996). Producción ovina. Zootecnia. Bases de producción animal. Vol 8.
- Byrd, S.R.; Flores-Foxworth, G.; Applewhite, A.A.; Westhusin, M.E. (1997). In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. Pgs: 857-864.
- Casao, A. (2007). Efecto de la melatonina en los procesos de IVM e IVF en la especie ovina. Universidad de Zaragoza, Departamento de producción animal.
- Cole, H.H., Hart, G.H. (1930). The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. Amer. J. Physiol. Pgs: 57-68.
- Coy, P., Gadea, J., Romar, R., Matás, C., García, E. (2002). Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. Pgs: 279–288.
- Del Campo, M. (1993). Fertilización in vitro. Instituto de Reproducción Animal Córdoba - Argentina-(IRAC). 1-20.
- De Loos, F.; Maurik, P.; Van Beneden, T.; Kruij, T. (1992). Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. Mol. Pgs: 208-214.
- Driancourt, M.A., Fry, R.C. (1992). Effect of superovulation with pFSH or PMSG on growth and maturation of the ovulatory follicles in sheep. Pgs: 279-292.
- Fernández, D. (1993). Principios de fisiología reproductiva ovina. Universidad de la República, pp. 247.
- Ferreira y Vasquez (2008). Evaluación del efecto de promotores de maduración ovocitaria in vitro en bovinos. Facultad de Medicina veterinaria. Universidad de La Salle.

- First, N. and J. Parrish. (1988). Sperm maturation and in vitro fertilization. Congr. Anim. Reprod. AI. London. Pgs: 160-168.
- Fry, R. C., Nial, E. M., Simpson, T. L., Squires, T. J., Reynolds, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. Vol. 47. Pgs: 977-987
- Fukui, Y. (1990). Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. Pgs: 40-46.
- Galina, C., Valencia, J. (2008). Reproducción de los animales domésticos. Tercera edición. Editorial Limusa. México.
- Gaviria, M. T. (2000). Reproducción 1; fisiología de la reproducción. Universidad de La Salle. Bogotá. 2000.
- Ginther, O.J., kot, K., Wiltbank, M.C. (1995). Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. Pgs: 689-703.
- Ginther, O.J., Kot, K. (1994). Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. Pgs: 987-1001.
- Gliedt, D.; Rosenkrans, C; Rorie, R.; Munyon, A.; Pierson, J.; Miller, G.; Rakes, J.(1996). Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro. Journal of Dairy Science 79:536-542.
- González-bulnes, A., García-García, R.M., Santiago-Moreno, J., Souza, C.J.H., López-Sebastián, A., Cocero, M.J., Baird, D.T. (2000). Effects of follicular population on endocrine and ovarian response in superovulated ewes.
- Gordon, I. (1996). Reproducción Controlada del Ganado Vacuno y Buffalo. Editorial acribia. S.A. Zaragoza, España.

- Grazul-Bilska, A.T., Kirsch, J.D., Bilski, J.J., Kraft, K.C., Windorski, E.J., Luther, J.S., Vonnahme, K.A., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. (2007). Superovulation in sheep: number and weight of the corpora lutea and serum progesterone.
- Guilbault I.a., grasso f., lussier j.g., rouillier p., matton p., (1991). Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. Pgs: 81-89.
- Guler, A. ; Poulin, N. ; Mermillod, P. ; Terqui, M. ; Cogié, Y. (1998) : Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. Pgs: 209-218.
- Gibory, G. and J. Millar. 1982. The Ovary: Follicle development, ovulation and luteal function. In Biochemistry of mamalian reproduction. Zeneveld, L. and Chatterton, R. Willey Interscience
- Hafez, E. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial McGraw Hill Interamericana. México.
- Hollinshead, F., Evans, G., Evans, K., Catt, S., Maxwell, W., O'Brien, J. (2004). Birth of lambs of a pre-determined sex after *in vitro* production of embryos using frozen-thawed raw spermatozoa. *Reproduction*, 127: 557-568.
- INEI, Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario (2012), Población de ganado ovino.
- IRAC. (2004). Fisiología de la reproducción de la vaca. Cordova Argentina.
- Jabbour, H.N., Evans, G. (1991). Ovarian and endocrine response of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. pgs: 93-106.

- Knobil, Ernst. The physiology of Reproduction. Vol.2. Segunda edición. Editorial Raven Press. U.S.A. 1993
- Ledda, S.; Bogliolo, L.; Laoni, G.; Naitana, S. (2001). Cell coupling and Maturation- Promoting Factor activity in In vitro- matured prepubertal and adult sheep oocytes. Biol. Reprod. pgs: 247- 252.
- Leibfried, L. and N. First. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. pgs: 76-86.
- Lee, E.; Y.Fujii and Y. Fukui. (1996). A comparative study on developmental capacity to blastocysts derived from 1 and 2 cell bovine embryos after in vitro maturation and fertilization. pgs: 1151-1162.
- Leoni, G., Rosati, I., Succu, S., Bogliolo, L., Bebbere, D., Berlinguer, F., Ledda, S., Naitana, S. 2007. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of in vitro produced ovine blastocysts. Reprod. Dom. Anim. 42: 299-304.
- Nagar, D., Purohit, N.G. (2005). Effect of epidermal growth factor on maturation and fertilization in vitro of goat follicular oocytes in a serum free or serum supplemented medium. pgs: 459-467.
- Mejia, V. (2009). Evaluacion de dos metodos de cultivo sobre la produccion *in vitro* de embriones bovinos. Revista CEC, Medicina Veterinaria y Zootecnia. 4 (2): 39-46.
- McDONALD´S. (2003). Veterinary endocrinology and reproduction. Editorial McGraw Hill Interamericana. Quinta edición, U.S.A.

- McKiernan, S.H., Bavister, B.D. (2000). Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. pgs:157-164.
- Moor, R.M., Osborn, J.C., Crosby, I.M., (1985). Gonadotrophin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. Pgs: 167-172.
- Morris, L., Randall, A., King, W., Jonson, W., Buckrell, B. (2003). The contribution of the male to ovine embryogenesis in an in vitro embryo production system. Anim. pgs: 9-26.
- Mossa, F., Leoni, G., Berlinguer, F., Succu, S., Madeddu, M., Bebbere, D., Naitana, S. (2008). Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances in vitro embryo yield in sheep. pgs: 134-145.
- Mueller J. (1993). Utilización de la inseminación artificial y la superovulación con transferencia de embriones en el mejoramiento genético de ovinos. Comunicación Técnica del INTA Producción Animal. pgs: 1-8.
- Murray, J.F., Downing, J.A., Scaramuzzi, R.J., Evans, G., (1994). Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. Pgs: 1337-1347.
- Navarro, M.C., Ducolomb, R.Y., Galindo, R.A., Rosado, G. (2006). Sheep oocytes matured in a simplex medium (HECM-1), an answer to in vitro fertilization. pgs: 275-276.
- O' Brien, J.K.; Dwarte, D.; Ryan, J.P.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. (1996). Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. pgs: 1029-1037.

- Ocaña, J.M., Gomez, R., Moreno, M., Santisteban, J.M. (1994). The effect of the Helium-Neon laser radiation on the in vitro fertilization of bovine oocytes. Proceedings of the 11th European Coll. Pgs: 174–8
- Palomares, R. (2006). Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) durante la maduración de ovocitos sobre la producción In vitro de ovocitos bovinos. UNIRA, Universidad de Zulia.
- Quirke, J.F., Hanrahan, J.P., Gosling, J.P. (1979). Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. J. Reprod. Fertil. 55, 37-44.
- Rao, B.S.; Naidu, K.S.; Amarnath, D.; Vagdevi, R.; Rao, A.S.; Brahmaiah, K.V.; Rao, V.H. (2002). Invitro maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. pgs: 31-36.
- Ravindra, J.P., Rawlings, N.C., Evans, A.C.O., Adams, G.P. (1994). Ultrasonographic study of ovarianfollicular dynamics in ewes during the estrous cycle. Pgs: 501-509
- Regueiro, M. (2010). Programa de producción y desarrollo ganadero.
- Risopatrón, J.; R. Sánchez; N. Sepúlveda; P. Peña; E. Villagran and W. Miska. (1996). Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/centrifugation. Pgs: 65-73.
- Rivadeneira, V. (2013), Ciclo estral bovino. Sistema de revisiones en investigación veterinaria de San Marcos – UNMSM, Lima - Perú.
- Ryan, G.J., Waddington, D. and Campbell, K.H.S. (1999). Addition of progesterone during bovine oocyte maturation in the presence of gonadotrophins improves developmental competence.

- Saeki, K.; Y. Nao; M. Hoshi and M. Nagai. (1995). Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein –free medium. Pgs: 751-759.
- SENAMHI. (2012). Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología Puno – Perú
- Scaramuzzi, R.J., *et al.* (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reproduction Fertility and Development*. pgs: 459-478
- Schrick T. (1993). Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. Pgs: 1133-1140.
- Shirazi, A., Ostad-Hosseini, S., Ahmadi, E., Heidari, B., Shams-Esfandabadi, N. (2009). In vitro developmental competence of ICSI derived activated ovine embryos. Pgs: 342-348.
- Stubbings, R.; Armstrong, D.; Beriault, R.; Basrur, P.; (1988). A method for aspirating bovine oocytes from small cesicular follicles: preliminary results. pg: 312.
- Thompson, J.G., Mitchell, M., Kind, K.L. (2007). Embryo culture and long-term consequences. pgs: 43–52.
- Universidad de Cataluña. (2005). Papel del factor de crecimiento epidérmico durante la maduración In vitro de ovocitos de cabras prepúberes, España.
- Vivanco, W. (2002). Mejoramiento genético bovino a través de tecnologías reproductivas de avanzada, III seminario internacional, competitividad en leche y carne, Medellín, pgs: 227-247.
- Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. In *fertilization and embryonic development in vitro*. New York. Pgs: 81-182.

- Wahid, H.; Monaghan, P.; Gordon, I. (1992). In vitro maturation (IVM) of the sheep follicular oocytes.
- Wan, P., Hao, Z., Zhou, P., Wu, Y., Yang, L., Cul, M., Liu, S., Zeng, S. (2009). Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine in vitro fertilization embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 114: 279-288.
- Wani, N. (2002). In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin. Res.* 44: 89-95.
- Wang, S.; Liu, Y.; Holyoak, G.R.; Evans, R.C.; Bunch, T.D. (1998). A protocol for in vitro maturation and fertilization of sheep oocytes. pgs: 83-88.
- Walker, S.K., Seamek, R.F., Quinn, P., Warmes, R. J., Ashman, R. J. Smith D.H., AAnvell, P. (1988). Culture of pronuclear embryos of sheep in a simple medium.
- Watanabe, H., Kimura, H., Ishida, N., Okada, M., Miyamoto, A., Fukui, Y. (1998). A simple superovulation method of a single injection of Follicle-Stimulating Hormone combined with Equine Chorionic Gonadotropin for superovulation of Suffolk ewes during the breeding season: II. The ovarian responses and the embryo qualities. *J. Reprod. Dev.* 44, 177-183.

ANEXOS

A-1

PREPARACION DE MEDIOS, EQUIPOS.

PREPARACION DE MEDIOS**Tabla 5:** Solución Buffer Fosfato Salino (PBS)(stock)

Para preparar	500 mL
Agua ultra pura.....	400 mL aprox.
NaCl.....	4 g
KCl.....	0.1 g
NaH ₂ PO ₄	0,72 g
KH ₂ PO ₄	0.12 g
Agua ultra pura	completar hasta 500mL

Tabla 6: Medio de maduración TCM-199

Para preparar	20 mL
TCM-199 (c/ sales de earl, 0.25 Mm hepes).....	17 mL
Penicilina.....	2000 UI
Estreptomicina.....	2 mg
FSH.....	10UI eCG
LH.....	10UI hCG
Suero de oveja.....	10%

Se filtró en un microfiltro de 0,22 μ .

Tabla 7: Medio Fert-Talp

Para preparar	20 mL
SBA.....	0.03gr
Gentamicina.....	2UI
Piruvato de Sodio.....	50 uL

Filtre con filtros de 0.22UI

Tabla 8: Medio Sperm-Talp

Para preparar	20
<u>mL</u>	
SBA.....	0.06gr
Gentamicina.....	2UI
Piruvato de Sodio.....	50 uL

Filtre con filtros de 0.22UI

Tabla 9: Medio de maduración TCM-199 + 10% Suero Oveja época no reproductiva

<u>Para preparar</u>	<u>20 mL</u>
TCM-199 (c/ sales de earl, 0.25 Mm hepes).....	17 mL
Penicilina.....	2000 UI
Estreptomicina.....	2 mg
FSH.....	10UI eCG
LH.....	10UI hCG
Suero de Suero Oveja época no reproductiva.....	10%

Se filtró en un microfiltro de 0,22 μ .

Tabla 10: Medio de maduración TCM-199 + 10% Suero Oveja Superovulada

<u>Para preparar</u>	<u>20 mL</u>
TCM-199 (c/ sales de earl, 0.25 Mm hepes).....	17 mL
Penicilina.....	2000 UI
Estreptomicina.....	2 mg
FSH.....	10UI eCG
LH.....	10UI hCG
Suero de Suero Oveja Superovulada.....	10%

Se filtró en un microfiltro de 0,22 μ .

5.1 Preparación del Suero Sanguíneo de Oveja Superovulada y Suero Sanguíneo de oveja en época no reproductiva

El suero sanguíneo de oveja fue obtenido de ovejas hembras, vacías (Época no reproductiva) y Ovejas súper ovuladas (Suero sanguíneo de ovejas súper ovuladas), las muestras se colectaron de la siguiente manera:

- a) Para el suero de oveja en época no reproductiva se utilizaron ovejas del mismo Camal provincial de Ilave, Para el Suero de oveja Superovulada se utilizaron ovejas del CIP Carolina de la universidad nacional del altiplano ubicado a 6Km. De la ciudad de Puno, Se extrajo sangre de las ovejas en tubos de ensayo y se dejaron en reposo durante 24 horas, para ambos casos.
- b) Luego de 24 horas se sometió a centrifugación a 3000 rpm por 10 min.
- c) El plasma sanguíneo se trató a una temperatura de 56 °C con la finalidad de desnaturalizar las proteínas del complemento.
- d) Posteriormente se depositó el suero en frascos pequeños en una cantidad de 2 mL bajo congelación debidamente rotulados.
- e) Finalmente se adicionó al TCM

EQUIPOS Y MATERIALES



Figura 1: Incubadora de cámara CO₂ para cultivos embrionarios (modelo MMM adcenter GmbH M-Group)



Figura 2: Gotas de 50 µL medio de maduración en placas de 35 mm con cubiertas con aceite mineral, y tuberculina con puntero adosado.



Figura 3: Bomba de CO₂.

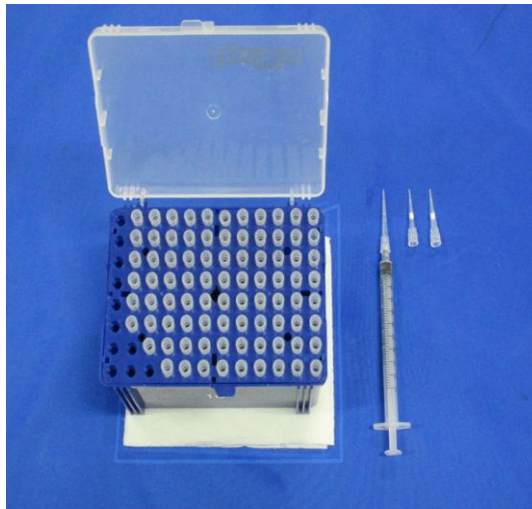


Figura 4: Jeringas de tuberculina adosadas a tips o punteros para manipulación de ovocitos.



Figura 5: Jeringa sin embolo de goma y aguja N° 18 para aspiración folicular.



Figura 6: Micro-dispensador para fertilización ovocitaria.

A-2

RECOLECCION Y PROCESAMIENTO DEL SUERO DE OVEJA

SUPERVULADA



Figura 7: Recolección del Suero de Oveja Súper Ovulada en el CIP Carolina – Universidad Nacional del Altiplano –Puno



Figura 8: Procesamiento del Suero de Oveja Súper ovulada.



Figura 9: Procesamiento del Suero de Oveja Súper ovulada.

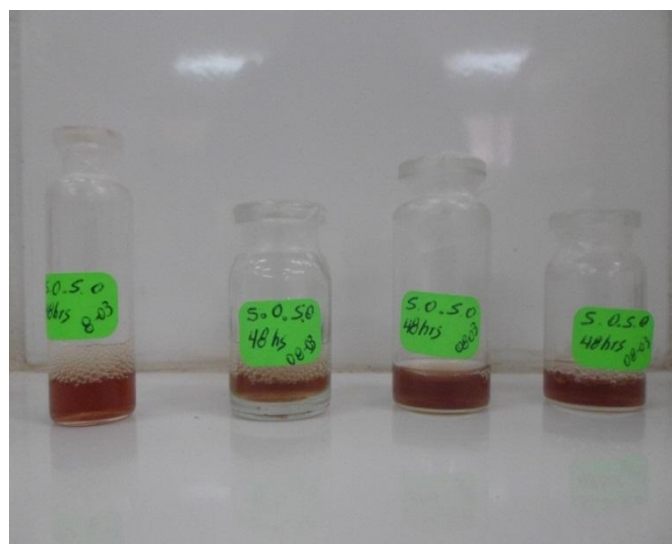


Figura 10: Suero de Oveja Súper Ovulada Procesado



Figura 11: Almacenamiento del Suero de Oveja Súper Ovulada.

A-3

MADURACION Y FERTILIZACION



Figura 12: Centro de Beneficio cárnico Camal Ilave



Figura 13: Recolección de ovarios del centro de beneficio.



Figura 14: Aspiración folicular.

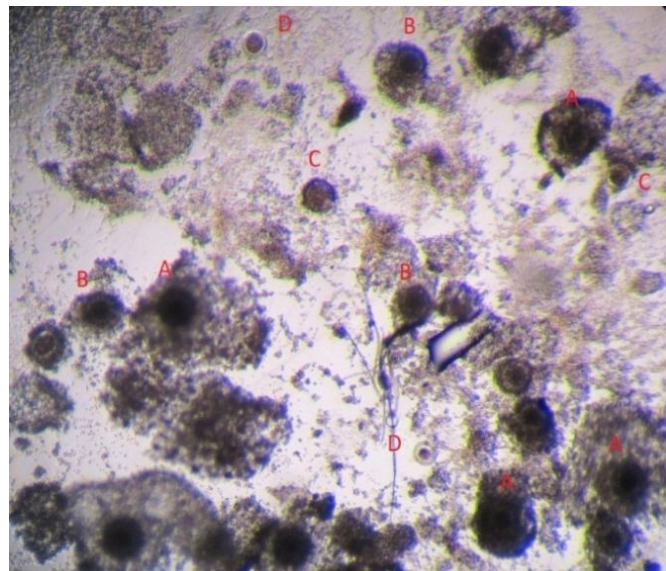


Figura 15: Ovocitos de categorías A, B, C y D. (40X)

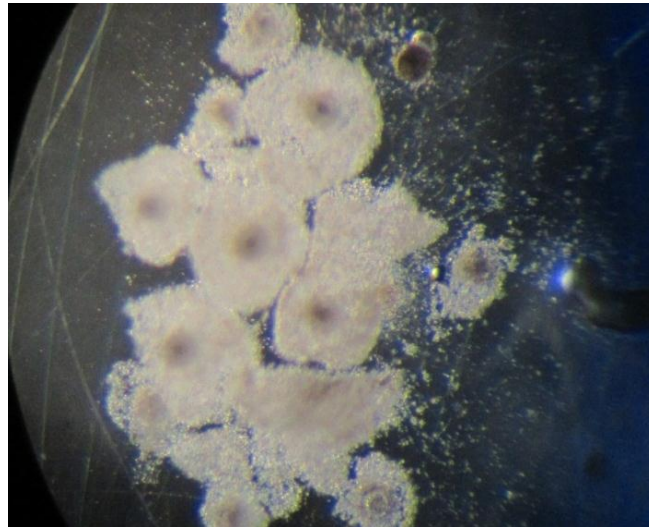


Figura 16: Ovocitos maduros con cúmulus expandido. (40X)



Figura 17: Ovocito maduro con presencia de I corpúsculo polar.



Figura 18: Pajilla de semen congelado.

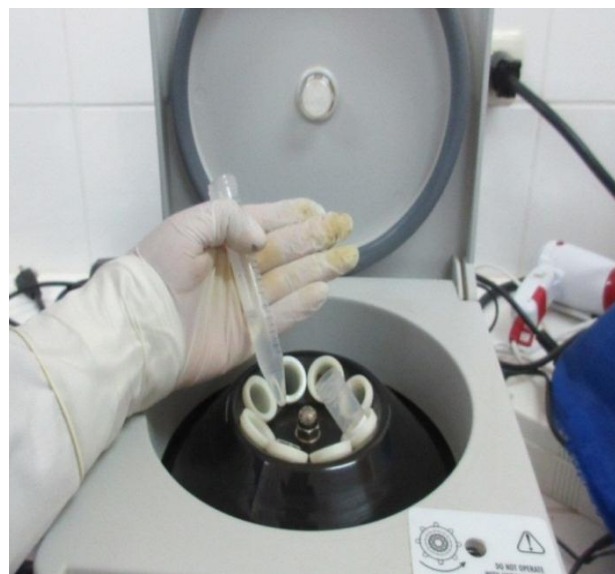


Figura 19: Lavado del semen sedimentación y re suspensión en medio BO.

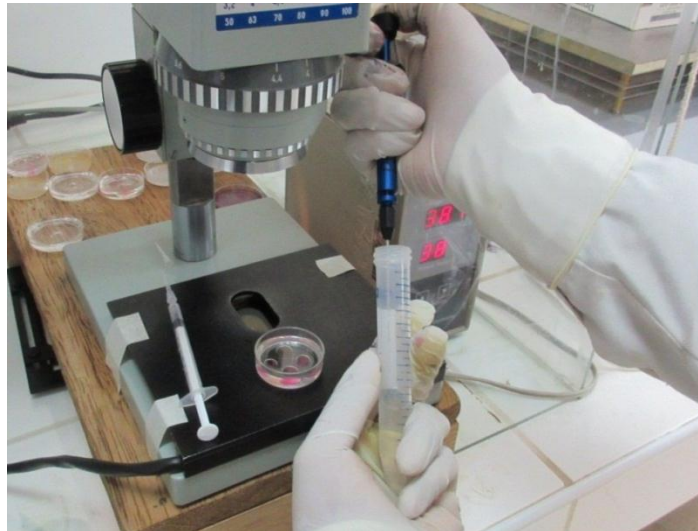


Figura 20: Capacitación espermática Swim up.

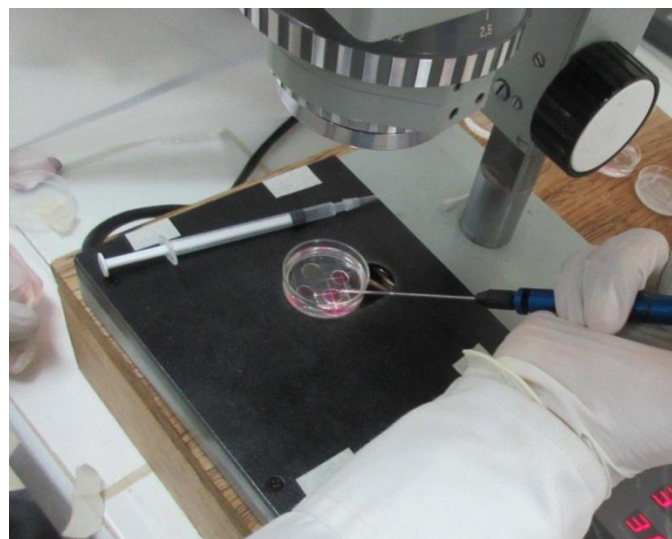


Figura 21: Fertilización.

A-4

EVALUACION DE MADURACION Y FERTILIZACION

EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DE CUMULUS

Expansión del cumulus ooforus.

La morfología de las células del cúmulo ha sido utilizada para seleccionar a los ovocitos destinados a la maduración in vitro y el grado de expansión del cúmulo se relaciona con la calidad del ovocito postmaduración (**Choi et al., 2001**), cuando se completa la metafase I la comunicación existente a través de las uniones gap se rompe de forma definitiva. Posteriormente, las células del cúmulo producen una gran cantidad de ácido hialurónico, que determina la mucificación y expansión del cúmulo (**Talbot et al., 2003**).

Morfología y grado de expansión de las células del cúmulo.

Para esto utilizamos la clasificación para el grado de expansión realizado por **Choi et al. (2001)**.

Grado de expansión 1° (+).

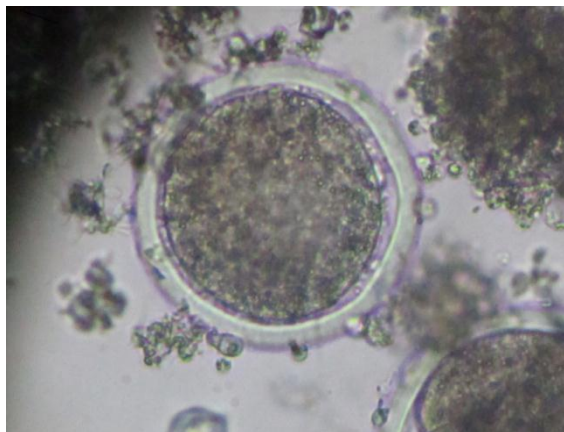


Figura 22: Grado I.

Este grado de expansión se apreció en el tratamiento TCM-199+Suero de oveja en época no Reproductiva en la segunda repetición, Se apreciaron células del cumulo sin expansión ni elasticidad, las cuales se desprenden fácilmente del ovocito al momento de realizar el lavado en el medio de cultivo y al momento de desnudarlos estos ovocitos se muestran inmaduros, células del cumulo libres y desprendidas del cumulo dentro del medio de cultivo.

Grado de expansión 2° (++)

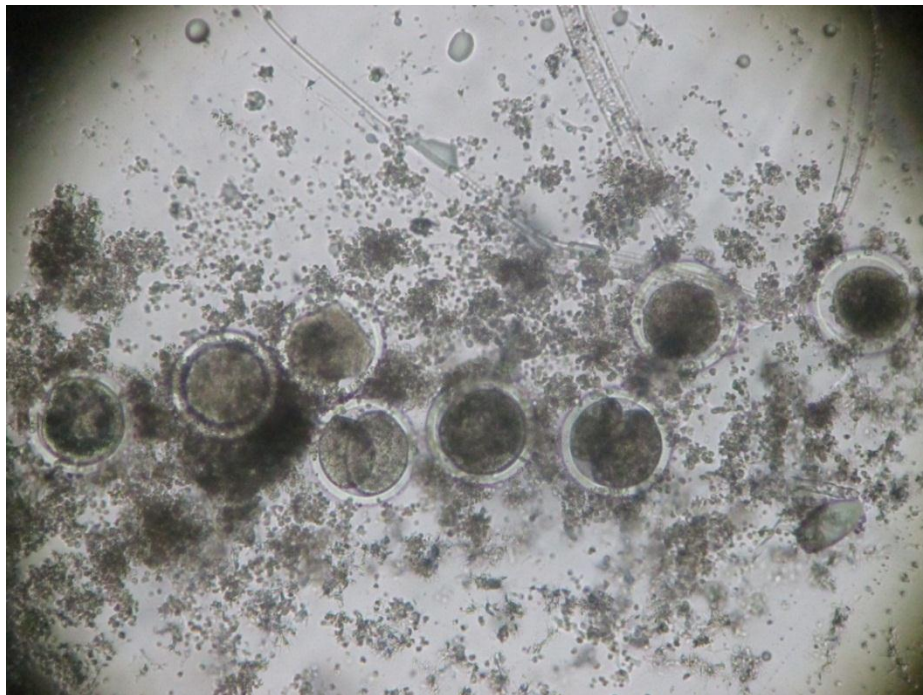


Figura 23: Grado II.

Este grado de expansión se observó en los tratamientos TCM-199+Suero de oveja en época no reproductiva. Aquí apreciamos células del cumulo con ligera expansión y elasticidad y algunas células del cumulo libres en el medio de maduración las cuales no se desprenden fácilmente en medio de lavado al desnudar se observan ovocitos maduros

Grado de expansión 3° (+++).

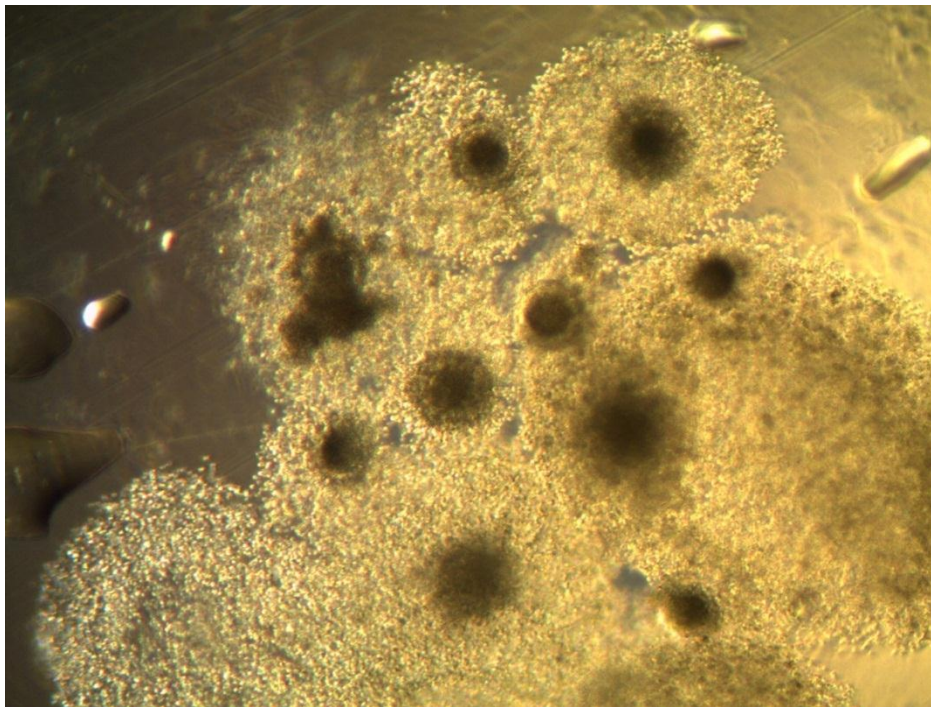


Figura 24: Grado III.

Tal grado de expansión se pudo apreciar en los tratamientos TCM-199 + Suero de Oveja Superovulada. Se observaron células del cúmulo totalmente expandidas y elásticas formando a manera de una sola masa celular no se aprecian células del cumulo desprendidas en el medio se observan las células del cumulo elásticas y viscosas y adheridas entre sí, las cuales no se desprenden unas de otras, luego de desnudarlas se observan ovocitos maduros con espacio perivitelino y primer corpúsculo polar muy definidos.

A-5

RESULTADOS

PRUEBA DE CHI CUADRADO PARA MADURACIÓN DE OVOCITOS**Tablas de Contingencia**

Columnas de variables:

TCM-199+suero oveja súper ovulada

TCM-199+suero oveja en época no reproductiva

Número de Observaciones: 162

Número de filas: 2

Número de columnas: 2

Tabla de Frecuencias

	TCM-199+suero oveja súper ovulada	TCM-199+suero oveja no reproductiva	Total por Fila
Ovocitos madurados	83	63	146
	51.23%	38.89%	90.12%
	79.31	66.69	
Ovocitos no madurados	5	11	16
	3.09%	6.79%	9.88%
	8.69	7.31	
Total por Columna	88	74	162
	54.32%	45.68%	100.00%

Contenido de las celdas:

Frecuencia Observada

Porcentaje de la Tabla

Frecuencia Esperada

Pruebas de Homogeneidad

Prueba	Estadístico	Gl	Valor-P
Chi-Cuadrada	3.808	1	0.0510

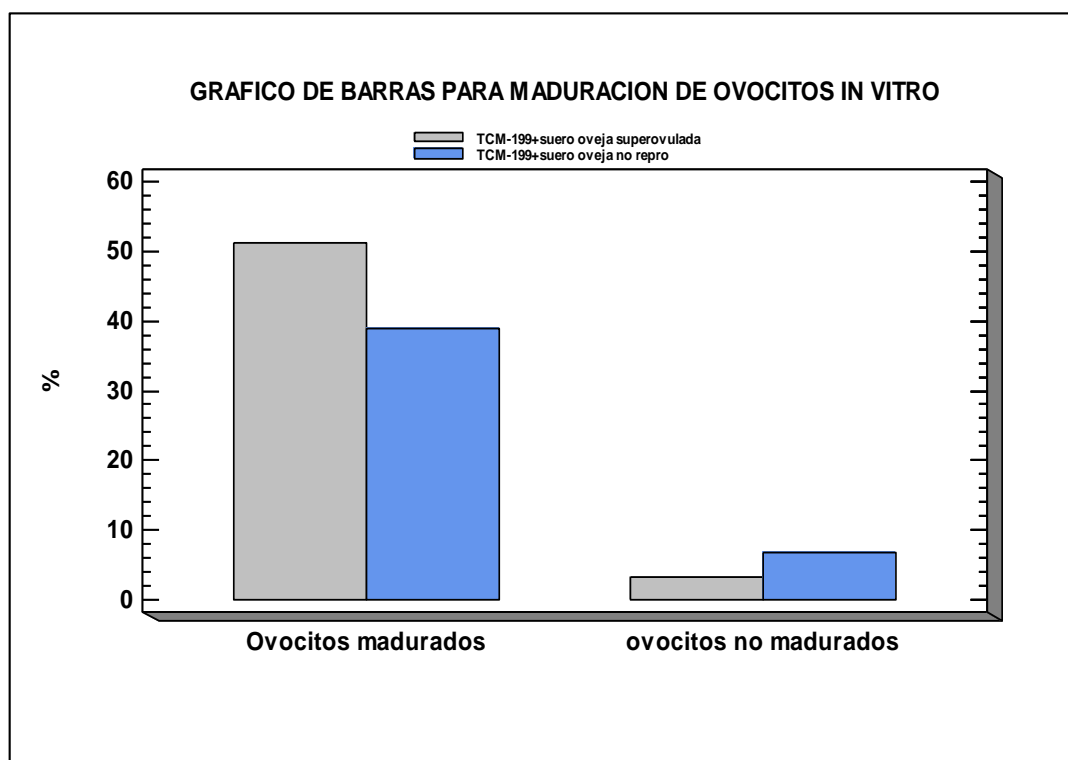
Interpretación:

Puesto que valor de P es mayor que el nivel de significación del 0.05 se concluye que el porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos es similar en los dos grupos.

La maduración en porcentaje con uso de suero de oveja súper ovulada es de 94.34%

La maduración en porcentaje con uso de suero de oveja en época no reproductiva es de 85.14%

Viendo los resultados la maduración in vitro de ovocitos es aparentemente superior usando suero de ovejas súper ovuladas frente a uso de suero de ovejas en época no reproductiva, pero estadísticamente son similares.



PRUEBA DE CHI CUADRADO PARA FERTILIDAD INVITRO CON EL TOTAL DE OVOCITOS MADURADOS

Tablas de Contingencia

Columnas de variables:

TCM-199+suero

TCM-199+suero oveja en época no reproductiva

Número de Observaciones: 146

Número de filas: 2

Número de columnas: 2

Tabla de Frecuencias

	TCM-199+suero oveja súper ovulada	TCM-199+suero oveja época no reproductiva	Total por Fila
Ovocitos fertilizados	51	43	94
Porcentaje de la Tabla	34.93%	29.45%	64.38%
Frecuencia Esperada	53.44	40.56	
Ovocitos no fertilizados	32	20	52
Porcentaje de la Tabla	21.92%	13.70%	35.62%
Frecuencia Esperada	29.56	22.44	
Total por Columna	83	63	146
Porcentaje de la Tabla total	56.85%	43.15%	100.00%

Contenido de las celdas:

Frecuencia Observada

Porcentaje de la Tabla

Frecuencia Esperada

Pruebas de Homogeneidad

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	0.724	1	0.3949

Interpretación:

Puesto que valor de P es mayor que el nivel de significación del 0.05 se concluye que el porcentaje de fertilización *in vitro* de ovocitos es similar en los dos grupos.

La fertilidad en porcentaje con uso de suero de oveja súper ovulada es de 61.45%

La fertilidad en porcentaje con uso de suero de oveja en época no reproductiva es de 68.25%

Viendo los resultados la fertilidad es aparentemente superior en fertilización *in vitro* usando suero de ovejas en época no reproductiva frente a uso de suero de ovejas súper ovuladas, pero estadísticamente son similares.

GRAFICO DE BARRAS PARA FERTILIZACION INVITRO DE OVOCITOS

