

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGIENERIA AGRONOMICA



TESIS DE GRADO

**EVALUACION DE DOS MEDIOS PARA LA MADURACION DE OVOCITOS
IN VITRO EN GANADO BOVINO (*Bous taurus*) EN CONDICIONES DE
ALTURA**

PRESENTADO POR:

Kevin Edson Carazas Loayza

LA PAZ – BOLIVIA 2018

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGIENERIA AGRONOMICA**

**EVALUACION DE DOS MEDIOS PARA LA MADURACION DE OVOCITOS
IN VITRO EN GANADO BOVINO (*Bous taurus*) EN CONDICIONES DE
ALTURA**

*Tesis de Grado presentado como requisito
Parcial para optar el título de
Ingeniero Agrónomo*

KEVIN EDSON CARAZAS LOAYZA

ASESOR:

M.V.Z. M.Sc. Ph.D. Celso Ayala Vargas

TRIBUNAL EXAMINADOR

Ing. Rubén Tallacagua Terrazas

Ing. Fanor Nicolás Antezana Loayza

Ing. Héctor Cortez Quispe

APROBADA

PRESIDENTE TRIBUNAL EXAMINADOR

.....

.....

2018

Dedicatoria

*A mis Padres: !!!Víctor Raúl Carazas
Conde y María Eugenia Loayza
Hermoso por haberme enseñado que
la vida se basa en objetivos y metas
que hay que cumplirlas, que soñar no
cuesta nada y que todo con sacrificio,
fe, esperanza, dedicación y optimismo
todo se puede lograr, esta es una más
de las metas que cumpla... una de las
más importantes, es por eso que esté
presente va dedicado con mucho
amor y sacrificio a ustedes mis padres
mi más grande orgullo de mi vida los
adoro!!!*

*A mis hermanos: Jhanyn y Sebastián por la
paciencia y apoyo incondicional que
siempre me brindaron en todo momento y
circunstancia.*

*A mi compañera de vida: Paola por el apoyo
incondicional brindado todo el tiempo y
por el regalo más bonito que uno puede
querer esa personita que va creciendo día a
día Agustín Thiago.*

Agradecimientos

A Dios y la Virgen por darme la oportunidad de vivir y culminar un propósito más en la vida.

A mis padres por haberme apoyado en toda circunstancia de la vida, por la formación educativa que me brindaron, por haberme ensañado que las metas hay que cumplirlas en todo momento y que en la vida todo tiene su tiempo.

A la Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía y todo el plantel Docente, quienes guiaron mi formación académica.

A la Estación Experimental Choquenaira por haberme facilitado sus predios como su laboratorio de criopreservación de semen para la realización del presente trabajo.

A mi Asesor: M.V.Z. M.Sc. Ph.D. Celso Ayala Vargas., por el apoyo incondicional otorgado a mi persona para la realización de este trabajo.

A mis Tribunales: Ing. Rubén Tallacagua Terrazas, Ing. Fanor Nicolás Antezana Loayza y al Ing. Héctor Cortez Quispe, los cuales, con sus sugerencias constructivas me ayudaron a complementar este trabajo de investigación.

A los Señores Eulogio Kantuta, Ing. Ayleen Mamani por haberme instruido en este trabajo de investigación.

Agradezco también a todos mis familiares abuelos, tíos, hermanos, primos y a todos los amigos que siempre estuvieron ahí apoyándome y dando esas palabras de aliento en todo momento.

ABREVIATURAS

AMPc	=	Adenosín mono fosfato cíclico
BSA	=	Albúmina sérica bovina
CCO's	=	Complejo cumulus ovocitos
CO ₂	=	Dióxido de carbono
Corpus luteum (CL)	=	Cuerpo Lúteo
eCG	=	Gonadotrofina Coriónica Equina
hCG	=	Gonadotropina coriónica humana
EGF	=	Factor de crecimiento epidérmico
EPV	=	Espacio perivitelino
FIV	=	Fertilización <i>In vitro</i>
FSH	=	Hormona Folículo Estimulante
GnRH	=	Gonadotropina
GV	=	Vesícula germinal
IA	=	Inseminación artificial
LH	=	Hormona Luteinizante
MII	=	Metafase II
NAHCO ₃	=	Bicarbonato de sodio
O ₂	=	Oxígeno
PBS	=	Solución Buffer Fosfato Salino
PI	=	Profase I
PIV	=	Producción <i>In Vitro</i>
REr	=	Retículo endoplásmico rugoso
SFB	=	Suero fetal bovino
SVC	=	Suero de vaca en celo
TCM-199	=	Medium Tissue Cultive

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	I
CONTENIDO.....	II
INDICE DE CUADRO.....	VIII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
INDICE DE GRAFICOS.....	IV
INDICE DE ANEXOS.....	IV
RESUMEN.....	XIII
SUMMARY.....	XIV

CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Justificación.....	3
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo General.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
2.3. Hipótesis.....	4
3. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Anatomía Reproductiva.....	5
3.1.1. Generalidades.....	5
3.1.2. Anatomía del aparato reproductor de hembras bovinas.....	5
3.1.2.1. Vagina.....	6
3.1.2.2. Cuello uterino o cérvix.....	6
3.1.2.3. Útero.....	6
3.1.2.4. Oviductos.....	6

3.1.2.5. Ovarios.....	7
3.2. El folículo ovárico	8
3.2.1. Iniciación de la foliculogénesis.....	9
3.2.2. Desarrollo folicular.....	9
3.2.2.1 Formación del folículo primordial	10
3.2.2.2. Crecimiento del folículo Preantral	10
3.2.2.3 Desarrollo del folículo antral	10
3.2.2.4 Folículo preovulatorio y ovulación.....	10
3.3. Cronología de Oocitos.....	11
3.4. Formación de los ovocitos	12
3.4.1. Descripción del Oocito Maduro.....	13
3.4.1.1. Morfología del oocito inmaduro.....	13
3.5. Maduración del Ovocito.....	13
3.5.1. Maduración nuclear	13
3.5.2. Maduración citoplasmática.....	14
3.5.3. Morfología del oocito maduro	15
3.6. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos.....	16
3.6.1. Recolección de Ovarios del Matadero.....	16
3.6.2. Selección del folículo.....	17
3.6.3. Obtención de los Ovoocitos.....	18
3.6.4. Selección y Clasificación de los Ovoocitos.....	18
3.7. Medios de Cultivo.....	19
3.7.1. Suplementación de los medios de cultivo.....	19

3.7.2. Reguladores de la maduración <i>in vitro</i>	20
3.7.3. Hormonas que participan en el desarrollo folicular.....	20
3.7.3.1. Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH).....	20
3.7.3.2. Hormona folículo estimulante (FSH).....	21
3.7.3.3. Hormona luteinizante (LH).....	21
3.7.4. La GnRH y la LH en la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	22
3.7.4.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	22
3.7.4.2. Hormona luteinizante (LH).....	22
3.7.5. Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	22
3.7.5.1. Temperatura.....	23
3.7.5.2. Osmolaridad.....	23
3.7.5.3. PH.....	23
3.7.5.4. Atmosfera Gaseosa.....	23
3.7.5.5. Duración de cultivo <i>in vitro</i>	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1. Localización.....	25
4.2. Características Generales de la Estación Experimental de Choquenaira.....	26
4.2.1. Fisiografía.....	26
4.2.2. Vegetación.....	26
4.2.3. Suelos.....	26
4.2.4. Características Climáticas.....	26
4.3. Material experimental.....	27

4.3.1. Material Biológico Ovarios.....	27
4.3.2. Equipos de laboratorio.....	27
4.3.3. Materiales de Laboratorio.....	27
4.3.4. Insumos.....	28
4.3.5. Otros Materiales Utilizados.....	28
4.3.6. Condiciones de Laboratorio.....	28
4.4. Métodos.....	28
4.4.1. Recuperación de ovarios del matadero.....	28
4.4.1.1. Control de Temperatura.....	29
4.4.1.2. Colección de Ovocitos.....	29
4.4.1.3. Método Selección y Clasificación de ovocitos.....	30
4.4.2. Método de maduración <i>in vitro</i>	30
4.4.2.1. Preparación de Materiales y Acondicionamiento.....	30
4.4.3. Preparación del medio de Maduración.....	31
4.4.3.1. Líquido Folicular más Hormona LH.....	31
4.4.3.2. Medio sintético TCM-199.....	32
4.4.4. Maduración de ovocitos.....	32
4.4.5. Evaluación Morfológica de la Maduración.....	33
4.4.5.1. Evaluación porcentaje de Recuperación de Ovocitos.....	33
4.5. Análisis Estadístico.....	34
4.6 Variables de Respuesta.....	35
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
5.1. Porcentaje de Maduración de Ovocitos.....	36

5.1.1. Categoría de Ovocitos.....	36
5.1.2. Medios de cultivo.....	36
5.1.3. Interacción Medios de cultivo por Categoría de Ovocitos.....	36
5.1.4. Coeficiente de Variación (C.V.) en la maduración de ovocitos.....	37
5.1.5. Prueba de Medias para Medios de Maduración de Ovocitos.....	37
5.1.6. Prueba de medias en la Interacción Medios de cultivo por Categorías de ovocitos.....	40
5.2. Maduración Nuclear.....	41
5.3. Porcentaje de Recuperación de Ovocitos.....	43
5.3.1. Categoría de Ovocitos.....	43
5.3.2. Prueba de Medias de Categoría de Ovocitos.....	44
5.3.3. Coeficiente de Variación (C.V.) del porcentaje de recuperación de ovocitos.....	45
5.4. Numero de folículos Ovario.....	47
5.5. Número de Ovocitos por Vaca.....	47
5.6. Tamaño de los folículos del ovario.....	49
5.7. Costos de Producción Maduración <i>in vitro</i>	51
5.7.1. Valor Bruto de Producción	52
5.7.2. Ingreso Bruto.....	52
5.7.3. Beneficio Costo.....	52
5.7.4. Interpretación.....	52

. CONCLUSIONES.....	53
7. RECOMENDACIONES.....	54
8. BIBLIOGRAFIA.....	55
Anexos.....	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de la Varianza.....	36
Cuadro 2. Coeficiente de Variación (C.V.)	37
Cuadro 3. Prueba de medias Test: Duncan	37
Cuadro 4. Prueba de medias Test: Duncan.....	40
Cuadro 5. Maduración Nuclear de Ovocitos.....	41
Cuadro 6. Análisis de la Varianza.....	43
Cuadro 7. Prueba de Medias Test: Duncan.....	44
Cuadro 8. Coeficiente de Variación (C.V.)	45
Cuadro 9. Detalle del número de ovocitos trabajados y encontrados.....	45
Cuadro 10. Resumen de recuperación de ovocitos.....	47
Cuadro 11. Detalle de tamaño y liquido folicular en el ovario.....	49
Cuadro 12. Costos de producción en la Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	51
Cuadro 13. Detalle de resultados.....	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Folículo ovárico Microscopía electrónica de barrido de un folículo ovárico maduro de rata. El ovocito se encuentra rodeado por las células del cumulus, varias capas de células de granulosa que contiene el antro folicular. Por fuera de la membrana basal se observa una capa de células de la teca.....	8
Figura 2. Folliculogénesis Representación esquemática de los cambios morfológicos durante el desarrollo folicular en el bovino. En los bovinos, el crecimiento de los	

folículos antrales mayores de 2 a 4 mm de diámetro es dependiente de gonadotrofinas.....	9
Figura 3. Estación Experimental de Choquenaira.....	25
Figura 4. Localización de la Estación experimental de Choquenaira.....	25

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de maduración de ovocitos con tres medios de maduración de ovocitos.....	38
Gráfico 2. Porcentaje de Maduración Nuclear de ovocitos.....	42
Grafico 3. Porcentaje de recuperacion de ovocitos según categoría.....	44
Gráfico 4. Cantidad de líquido folicular en los folículos de los ovarios.....	50

INDICE DE ANEXOS

Anexos.....	64
Anexo 1 Preparación de Medios.....	65
Solución Buffer Fosfato Salino (PBS) stock.....	66
Medio de Maduración Líquido Folicular + LH + Heparina.....	66
Medio de Maduración TCM.....	67
Regulador de PH.....	67
ANEXO 2 Materiales y Equipos.....	68
Foto 1. Baño María utilizado como incubadora.....	69

Foto 2. Dispositivo portátil de 500 ml (no convencional) para maduración.....	69
Foto 3. Placa térmica.....	69
Foto 4. Microscopio Electrónico.....	70
Foto 5. Centrifugadora.....	70
Foto 6. Balanza Electrónica.....	71
Foto 7. Mufla Para la desinfección de Materiales.....	71
Foto 8. Cajas Petri con gotas de medio de Maduración cubiertas con aceite mineral.....	72
Foto 9. Dispositivo portátil dentro baño maría.....	72
Foto 10. Micropipeta de 200 µl para la aspiración de Ovocitos y hormonas.....	73
Foto 11. Refrigerador para la congelación de medios y materiales.....	73
Foto 12. Ovarios con más 3 mm de folículos.....	74
Foto 13. PH metro.....	74
ANEXO 3 Maduración.....	75
Foto 14. Extracción de ovarios de los úteros de vacas recién sacrificadas.....	76
Foto 15. Embolsado de Ovarios colectados en cloruro de sodio al 0.9 % más antibiótico de penicilina y estreptomina.....	76
Foto 16. Medición de la temperatura los termos en el transporte.....	77

Foto 17. Estandarización de temperatura introduciéndolo a baño maría.....	77
Foto 18. Aspiración folicular de los ovarios colectados y atemperados en baño maría.....	78
Foto 19. Folículos aspirados de Ovarios colectados.....	78
Foto 20. Asentamiento de ovocito a la parte inferior del tubo cónico.....	79
Foto 21. Descongelación de medio de maduración en la placa térmica.....	79
Foto 22. Eliminación de Líquido folicular y traspaso de ovocitos a cajas petri.....	79
Foto 23. Filtrado de aceite mineral.....	80
Foto 24. Separación de ovocitos de las impurezas que se encuentran en el folículo.....	80
Foto 25. Ovocitos seleccionados para la maduración in vitro de distintas Categorías A, B, C Y D.....	81
Foto 26. Selección de ovocitos puesto en las gotas de medio de maduración.....	82
Foto 27. Traslado de cajas Petri más ovocitos seleccionados al dispositivo portátil y acondicionamiento de CO ₂ y extracción de aire.....	83
Foto 28. Traspaso del dispositivo portátil con las cajas Petri al baño maría a temperatura de 38.5 °C durante 24 horas.....	83
ANEXO 4 Evaluación de la Maduración de Ovocitos.....	84

Foto 29. Extracción del dispositivo portátil del baño maría después de las 24 horas de la maduración de <i>in vitro</i>	85
Foto 30. Ovocitos seleccionados para la Maduración <i>in vitro</i> de categoría A pasando a maduración nuclear.....	86
Foto 31. Ovocitos para la maduración <i>in vitro</i> de categoría observando maduración nuclear y expansión de cumulus.....	87
Foto 32. Ovocitos seleccionados para la Maduración <i>in vitro</i> de categoría B antes de la maduración, obtención de ovocitos maduros de categorías A y B. Observando el comienzo de expansión, formación y desfragmentación de cumulus.....	88
Foto 33. Ovocitos seleccionados para la maduración <i>in vitro</i> de categoría C antes de la maduración, obtención de ovocitos maduros de categorías B llegando a tener expansión de cumulus.....	89
Foto 34. Ovocitos seleccionados para la Maduración <i>in vitro</i> de categoría D antes de la maduración, obtención de ovocitos maduros de categorías C, D Observando el comienzo de expansión y desfragmentación de cumulus...	90

RESUMEN

En la investigación el objetivo principal fue evaluar dos medios de maduración de ovocitos bovinos en condiciones de altura en el altiplano boliviano a una altitud de 3870 m.s.n.m., para posteriormente llegar a una fertilización *in vitro* (FIV), Producción *in vitro* (PIV), hasta una posible transferencia.

Al evaluar el porcentaje de maduración de ovocitos utilizando el medio de maduración Líquido Folicular con Hormona Luteinizante (LH) se obtuvo un porcentaje de 31,79% en la maduración, con el medio Líquido Folicular sin Hormona (Testigo) solo obtuvimos 30,77% de maduración y con el medio sintético de maduración de ovocitos TCM-199 obtuvimos mejores resultados llegando a alcanzar un 44,77% de maduración *in vitro* de ovocitos, todos los medios fueron evaluados después de las 24 horas de ser cultivados en baño maría.

En la maduración nuclear de ovocitos utilizando el medio Líquido Folicular con Hormona LH se obtuvo 14,89% de maduración nuclear, con el medio sintético de maduración de ovocitos TCM-199 se llegó un 35,62% de maduración nuclear de ovocitos y con Líquido Folicular sin Hormona (Testigo), se tuvo 16,67% de maduración nuclear de ovocitos.

En la investigación se recuperó 538 ovarios, los cuales fueron extraídos de animales sacrificados del matadero municipal “Los Andes” de la ciudad de El Alto equivalente a 269 vacas. Para la colecta de los ovocitos se aplicó la técnica Punción y Aspiración obteniendo un porcentaje de recuperación de ovocitos, del 82,09% que representa 724 ovocitos recuperados y un 17,91% que representa 158 ovocitos los cuales no fueron tomados en cuenta por presentar distintas características no aptas para una maduración *in vitro*, todos los ovocitos recuperados fueron observados y contados en un estereoscopio (20x) que separamos en distintas categorías morfológicas llegando a encontrar 175 ovocitos de categoría A, 199 ovocitos de categoría B, 194 de categoría C y 156 de categoría D.

Palabras Clave: Maduración *in vitro*, recuperación de ovocitos, maduración nuclear, ovocitos.

SUMMARY

In the research the main objective was to evaluate two means of maturation of bovine oocytes in high altitude conditions in the Bolivian Altiplano at an altitude of 3870 m.s.n.m., to later reach in vitro fertilization (IVF), in vitro production (PIV), until a possible transfer.

When evaluating the percentage of maturation of oocytes using the Follicular Fluid maturing medium with Luteinizing Hormone (LH), a percentage of 31.79% was obtained in the maturation, with the follicular liquid medium without Hormone (Control) we only obtained 30.77% of maturation and with the synthetic means of oocyte maturation TCM-199 we obtained better results reaching a 44.77% maturation in vitro of oocytes, all media were evaluated after 24 hours of being cultured in a water bath.

In the nuclear maturation of oocytes using the Follicular Liquid medium with LH Hormone, 14.89% of nuclear maturation was obtained, with the synthetic means of oocyte maturation TCM-199 a 35.62% nuclear maturation of oocytes was reached and with Liquid Follicle without Hormone (Control), there was 16.67% nuclear maturation of oocytes

In the investigation, 538 ovaries were recovered, which were extracted from slaughtered animals from the "Los Andes" municipal slaughterhouse in the city of El Alto, equivalent to 269 cows. For the collection of the oocytes, the Puncture and Aspiration technique was applied, obtaining a percentage of oocyte retrieval, of 82.09% representing 724 recovered oocytes and 17.91% representing 158 oocytes, which were not taken into account due to their different characteristics. not suitable for in vitro maturation, all recovered oocytes were observed and counted in a stereoscope (20x) that we separated into different morphological categories, reaching 175 category A oocytes, 199 category B oocytes, 194 category C oocytes and 156 oocytes. category D.

Key Words: maturation *In vitro*, Recovery of oocytes, maturation nuclear, oocytes.

1. INTRODUCCION

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

La biotecnología de la reproducción comprende a las técnicas (desde la inseminación artificial (IA) hasta la clonación), que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales. Es uno de los productos más emblemáticos de la investigación del control y dominio de las ciencias de la vida y la zootecnia, porque logro incrementar con éxito, el progreso genético de los hatos, destinados a la producción de carne, leche, a través de las tecnologías aplicadas comercialmente desde mediados del siglo XX.

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

Se han formulado una gran cantidad de medios de cultivo cuya composición y finalidad es asegurar el mantenimiento de los requisitos metabólicos y energéticos que el oocito necesita para su maduración fuera del folículo ovárico, todos los medios de maduración llevan formulaciones complejas de aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas, nucleótidos, etc. Se utilizan en mayor o menor medida, para los procesos de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* por diversos equipos. La importancia del medio de cultivo para la maduración de los oocitos *in vitro* es tal que, según algunos autores, condiciona el éxito de los sistemas de fecundación y el posterior desarrollo *in vitro* de los embriones (Rose y Bavister, 1992).

Todo el sistema de producción *in vitro* requiere la maduración de los ovocitos, de cuyo éxito depende de él para una buena fertilización. Los ovocitos inmaduros pueden madurar en un cultivo *in vitro* bajo condiciones adecuadas cumpliendo un papel fundamental para la obtención de una mayor tasa de ovocitos fertilizados (Ahuja et al., 2009).

La recuperación de ovarios en el matadero se realiza mediante la intervención del recolector en el inicio de la cadena de matanza. Los ovarios se obtienen de vacas o novillas en diferentes estados fisiológicos dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales (Leibfried y First, 1979).

Estos ovarios presentan en su superficie una cantidad variable de estructuras: folículos, cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos y cuerpos albicans, la apariencia de la superficie de estos folículos, puede ser utilizada como criterio de selección de los futuros ovocitos y mejorar los índices de maduración *in vitro* (Machatkova et al., 1996).

1.1. Antecedentes

La producción *in vitro* de embriones representa una interesante opción, en los sistemas productivos bovinos. Los progresos obtenidos en maduración y fertilización *in vitro* de embriones bovinos, posibilitan la utilización de esta técnica en planes reproductivos en ejemplares de elite.

Uno de los estudios más destacados fue realizado por Sreenan, (1970) en bovinos, quien utilizó semen de toro pre incubado en un medio con α -amilasa con el propósito de intentar fecundar *in vitro* a ovocitos madurados *in vitro*. Sin embargo, fueron Iritani y Niwa, (1977) en Japón, quienes lograron finalmente la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos madurados en cultivo.

Evaluando la eficacia del sistema con el nacimiento de crías unos años más tarde el trabajo de Brackett et al., (1982), provocó un gran impacto ya que informaba del nacimiento en E.E.U.U. del primer ternero producido mediante fecundación *in vitro* de ovocitos ovulados y recuperados del oviducto.

Casi simultáneamente Lambert et al (1983), en Canadá, empleando técnicas de laparoscopia para obtener ovocitos directamente del ovario de la hembra en un momento próximo a la ovulación, consiguieron por fecundación *in vitro* dos nuevos nacimientos. Unos años más tarde, Hanada et al., (1986) informaron nacimientos a partir de ovocitos madurados y fecundados *in vitro*.

Todos estos estudios fisiológicos y metabólicos realizados en ovocitos, espermatozoides y embriones de mamífero en relación con el microambiente que los rodea, han permitido ampliar los conocimientos en el campo de la biología de la reproducción. En los últimos años, las investigaciones se han centrado en la regulación ejercida por diversos factores ovocitarios sobre las funciones de las células del cúmulus (Gilchrist et al., 2008), el rol que desempeñan distintos factores de crecimiento durante la maduración *in vitro* del ovocito (Shabankareh y Zandi, 2010).

1.2. Justificación

La maduración de ovocitos *in vitro* es la base de muchas tecnologías aplicadas a la reproducción. En bovinos permite aumentar el potencial reproductivo de las hembras, la conservación de gametos de animales de alto valor genético permitiendo el manejo de una gran población y a bajo coste, la generación de animales transgénicos, hasta llegar a tecnologías como la clonación.

De esta manera, en este trabajo se intenta analizar la posible actuación que tienen estos medios de maduración de ovocitos en la altura, los medios de maduración son suplementados con hormona LH y Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) sobre el siguiente aspecto, la expansión del cúmulo celular durante la maduración *in vitro* de los oocitos en condiciones de altura del altiplano boliviano, ya que, esta es una de las referencias que pueden indicar el grado de maduración alcanzado por el ovocito para que esta pueda ser utilizado en el futuro para una: Fertilización *In Vitro* (FIV), Producción *In Vitro* (PIV), hasta una posible transferencia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Evaluación de dos medios de maduración de ovocitos *in vitro* en ganado bovino (*Bous taurus*) en condiciones de altura.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el medio de maduración más eficiente para los ovocitos.
- Validar la técnica Punción y Aspiración en la recuperación de ovocitos.
- Clasificar morfológicamente los ovocitos madurados.
- Determinar los costos de producción de ovocitos madurados *in vitro* en ganado bovino.

2.3. Hipótesis

- Ho: La utilización de los medios de maduración de ovocitos no tiene significancia en la maduración *in vitro* de ovocitos en ganado bovino (*Bous taurus*), así como también en los costos de producción.

3. REVISION BIBLIOGRÁFICA

3.1. Anatomía Reproductiva

3.1.1. Generalidades

La anatomía de los órganos reproductores cambia considerablemente con la edad y la actividad fisiológica, la descripción inicial se refiere a los órganos genitales de la vaca adulta. Los ovarios adultos están situados en la parte más caudal del abdomen, como resultado de esto, los cuernos uterinos son arrastrados también caudalmente hacia sus fijaciones ováricas y excepto durante la gestación avanzada, no adoptan posiciones más craneales en la cavidad abdominal (Dyce et al., 2006).

3.1.2. Anatomía del aparato reproductor de hembras bovinas

El aparato genital de las hembras está capacitado para la producción de ovocitos y facilita su unión con los espermatozoides, así como el posterior alojamiento del embrión y el feto hasta el nacimiento. Para su estudio el aparato reproductivo de la hembra se ha clasificado en órganos genitales externos e internos (Gázquez y Blanco, 2004).

Dentro de las estructuras externas importantes está la vagina, conecta con la vulva formando un canal muy importante como receptáculo del pene durante el coito, así como al momento del parto para la expulsión del feto. Hacia el exterior se conecta con la vulva, constituida por dos labios y sus comisuras y el clítoris que se localiza dentro de ella (Sisson et al., 2005).

Los órganos genitales internos como el cérvix y el útero están sostenidos por el ligamento ancho. Este ligamento consta del mesoovario, que sostiene al ovario; el mesosálpinx, que sostiene el oviducto; y el mesometrio, que sostiene al útero.

En bovinos, la inserción del ligamento ancho es dorso lateral en la región del íleon, del modo que el útero está dispuesto como los cuernos de un carnero, con la convexidad dorsal y los ovarios situados cerca de la pelvis (Hafez y Hafez, 2005).

3.1.2.1. Vagina

Está ubicada horizontalmente y paralela al recto, por encima de la vejiga. El tamaño de la vagina es aproximadamente de 25 centímetros, las paredes de la vagina son elásticas y segregan una sustancia lubricante durante el parto y en los períodos de celo o calor. La vagina está localizada dentro de la cavidad pélvica, entre la vulva y el cuello del útero (Camargo, 2010).

3.1.2.2. Cuello uterino o cérvix

Forma parte del útero y es una estructura de tipo cilíndrica con bordes transversales o espirales alternados, llamados anillos (generalmente son tres), los cuales representan el segundo obstáculo para la inseminación Artificial. El cérvix mide de 8 a 10 cm. Y entre sus principales funciones están las de facilitar el transporte de los espermatozoides hacia la luz del útero mediante la producción de moco, actúa como reservorio de espermatozoides y durante el celo, la musculatura lisa del cérvix se relaja bajo la influencia de estrógenos (Bespín et al., 2007).

3.1.2.3. Útero

El útero consta de un cuerpo y dos cuernos (derecho e izquierdo), su interior está recubierto de una membrana mucosa, llamada endometrio con abundantes glándulas simples, excepto en las carúnculas que no son glandulares. Las carúnculas son proyecciones de la superficie interna del útero, donde se fijan, por medio de los cotiledones, las membranas fetales durante la gestación. El cuerpo del útero se bifurca en dos cuernos y es en uno de estos donde se va a implantar el embrión y a desarrollar el feto durante el período de gestación. Las carúnculas durante la preñez aumentan su tamaño (Yanguma, 2009).

3.1.2.4. Oviductos

Son tubos sinuosos en un número de dos, de 20 a 30 cm de longitud que se extienden desde las extremidades de los cuernos hasta los ovarios, captan al óvulo y lo conducen hacia el útero. Se dividen en tres regiones:

- a) Pabellón, formado por fimbrias que toman la forma de embudo.
- b) Ámpula tubárica, tiene un diámetro de 3 a 5 mm y es donde se produce la fecundación.
- c) Istmo, tiene un diámetro de 0,8 a 1 mm, es el más largo y se extiende desde el ámpula hasta el cuerno correspondiente (Perea, 2012).

Cada uno de estos segmentos está adaptado para desempeñar su función. Por lo tanto, el oviducto a través de su motilidad recibe el óvulo u óvulos y empuja los cigotos hacia el interior del útero, mientras que su secreción proporciona un entorno adecuado para la supervivencia de los gametos, su fertilización y para los primeros días críticos de la vida embrionaria (Motta, 2012).

3.1.2.5. Ovarios

Los ovarios de la vaca miden normalmente de 3,5 a 4 cm de longitud, 2,5 cm de ancho y tienen alrededor de 1,5 cm de grosor en su porción mayor, el peso es de 15 a 20 g (Sisson et al., 2005).

En bovinos y ovinos, el ovario tiene forma de almendra. El ovario, a diferencia del testículo, permanece en la cavidad abdominal. Realiza tanto funciones exocrinas (liberación de óvulos) como endocrinas (esteroidegénesis). El ovario no funciona como una glándula de secreción interna, pero contiene el patrimonio genético, consistente en varios miles de folículos primordiales. Los ovarios, sometidos a la influencia y control de las hormonas gonadales, son las responsables del ciclo estrual de la hembra, además del crecimiento y maduración de las células sexuales femeninas, denominadas óvulos. La función endocrina de los ovarios es la de producir hormonas sexuales denominadas estrógenos, necesarias para acondicionar el aparato reproductor para la recepción del macho y un acondicionamiento favorable para la fecundación del óvulo. Los estrógenos promueven y mantienen los caracteres sexuales secundarios. Son capaces de desarrollar una glándula endocrina temporal denominada corpus luteum, (cuerpo lúteo) que secreta la hormona progesterona,

responsable de preparar al endometrio para la implantación y nutrición del cigoto (Squires, 2003).

Las hormonas ováricas son producidas por dos estructuras cíclicas, folículo y cuerpo lúteo, responsables de todas las modificaciones del aparato genital femenino que se producen durante el ciclo estrual. Los elementos cíclicos ováricos tienen una vida breve, contenida complejamente en el arco del ciclo estrual. En cada ciclo se forma, indiferentemente en el ovario derecho o izquierdo, un folículo del cual deriva un cuerpo lúteo, continuando de esta forma durante toda la vida sexual si no aparecen gestaciones o factores patológicos. Los dos ovarios son interdependientes y funcionan al unísono como si se tratase de un único órgano (Quintela et al., 2006).

3.2. El folículo ovárico

El folículo es la unidad morfológica y funcional del ovario. Está formado por una capa exterior de células tecales que envuelve, por fuera de la membrana basal, capas internas de células de la granulosa. A su vez, las células de la granulosa rodean y confinan al complejo formado por el ovocito y las células del cumulus (Figura 1).



Fuente Biblioteca Digital FCEN-UBA 2010

Figura 1. Folículo ovárico Microscopía electrónica de barrido de un folículo ovárico maduro de rata. El ovocito se encuentra rodeado por las células del cumulus, varias capas de células de granulosa que contiene el antro folicular. Por fuera de la membrana basal se observa una capa de células de la teca (Richards, 1979).

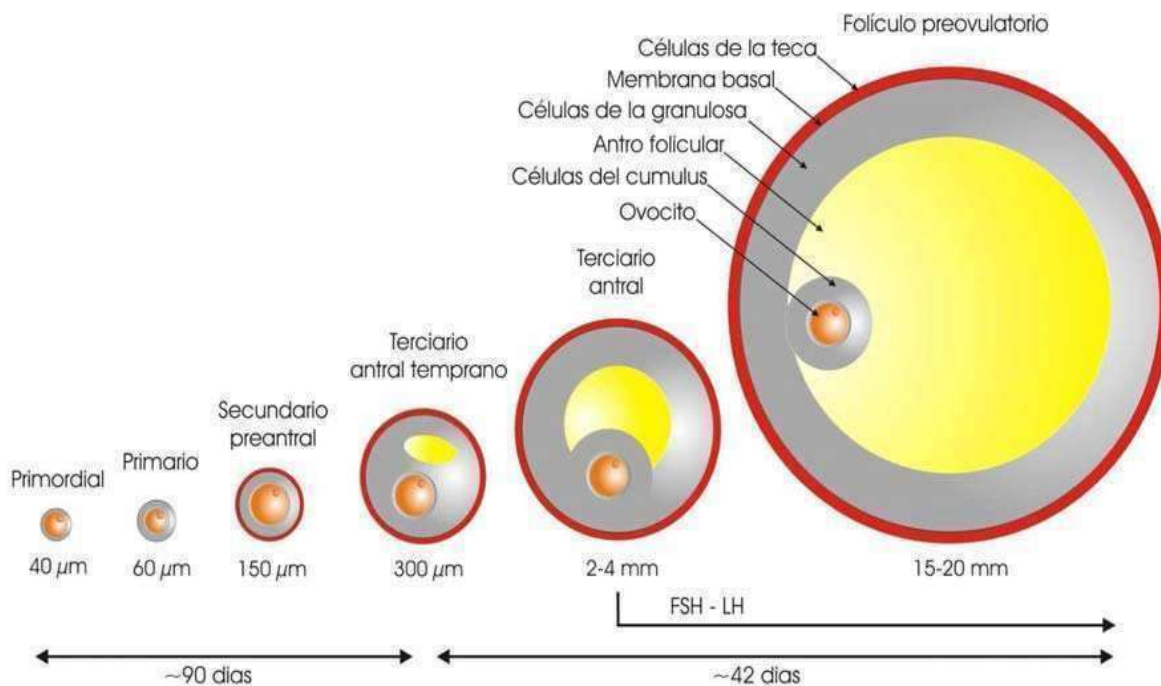
3.2.1. Iniciación de la foliculogénesis

La iniciación de la foliculogénesis puede reconocerse en bovinos a partir del día 140 de gestación, cuando las células de la granulosa de un folículo primordial muestran una morfología cuboide y un incremento en su número, convirtiéndose en un folículo primario (Hyttel et al., 1997 y Russe, 1993).

Una vez comenzado, el crecimiento folicular continúa a lo largo de toda la vida fértil independientemente del estado fisiológico, de la fase del ciclo estral, de los niveles de gonadotrofinas, y aún durante la preñez (Edwards et al., 1977).

3.2.2. Desarrollo folicular

El crecimiento y diferenciación del ovocito, y la proliferación y diferenciación de las células somáticas que lo rodean ocurren de manera coordinada en las distintas etapas de la foliculogénesis (Figura 2).



Fuente Biblioteca Digital FCEN-UBA 2010

Figura 2. Foliculogénesis Representación esquemática de los cambios morfológicos durante el desarrollo folicular en el bovino. En los bovinos, el crecimiento de los folículos antrales mayores de 2 a 4 mm de diámetro es dependiente de gonadotrofinas.

3.2.2.1. Formación del folículo primordial

En el estadio temprano de la diferenciación de la gónada femenina, las células de la pregranulosa, provenientes del ovario de rata y del epitelio superficial, se organizan alrededor de los ovocitos primarios (Byskov y Hoyer, 1994).

3.2.2.2. Crecimiento del folículo Preantral

Cuando el folículo primario entra en la fase de crecimiento el ovocito aumenta de tamaño y las células de la granulosa comienzan a proliferar. Se origina entonces un folículo multilaminado denominado folículo secundario. Aunque los folículos preantrales son capaces de responder a gonadotrofinas, su crecimiento es independiente de ellas y parece estar regulado por mecanismos intraováricos e intrafoliculares (McGee y Hsueh, 2000).

3.2.2.3. Desarrollo del folículo antral

Durante el desarrollo folicular, la formación del antro folicular representa el comienzo de la transición de la regulación primaria intrafolicular a la regulación extraovárica. El eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en la hembra integra señales del cerebro, pituitaria y ovario y produce hormonas que coordinan la maduración folicular con el comportamiento sexual y la preparación fisiológica para la preñez. El hipotálamo produce y secreta GnRH de manera pulsátil directamente en el sistema porta hipofisario, el crecimiento del folículo antral, a diferencia de lo que ocurre en los estadios anteriores, es rápido, y está caracterizado por la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, la diferenciación de la teca, y la acumulación de fluido folicular (Everett, 1994).

3.2.2.4. Folículo preovulatorio y ovulación

El folículo preovulatorio o folículo de Graaf es el que presenta una esteroideogénesis más activa y el que presenta una mayor respuesta a gonadotrofinas. Las células tecales producen mayor cantidad de andrógenos en respuesta a LH y las células de la granulosa incrementan su actividad aromataza en respuesta a FSH, sintetizando cantidades máximas de estradiol. La acción conjunta de FSH y estradiol induce la

expresión de receptores de LH en las células de la granulosa. El pico preovulatorio de LH juega un papel central en el desencadenamiento de la cascada de eventos en los folículos preovulatorios, esencial para la ovulación de un ovocito fertilizable (Hsieh et al., 2007).

3.3. Cronología de Oocitos

El ovario fue reconocido ya como una entidad anatómica independiente por Herófilo de Alejandria (300 A.C.) y descrito con detalle por Sorano de Efeso (50 D.C.); sin embargo, el oocito de los mamíferos no pudo ser identificado hasta el siglo XIX (Von Baer, 1827). Anteriormente, De Graaf (1670), señaló acertadamente, que los oocitos provenían del ovario, aunque se equivocó al considerar que todo el folículo (folículo de Graaf) era el gameto femenino. En el año 1825 Von Baer describe la relación anatómica existente entre el folículo y el oocito en mamíferos. Waldeyer (1870), fue el primer investigador en plantear que las hembras de los mamíferos poseían una cantidad finita de oocitos, que es única para toda su vida reproductiva. Zuckermann et al, demostraron en la década de los años 1950, la exactitud de esa teoría. Goette (1875) y Nussbaum (1880), reconocieron que las células primordiales germinales, destinadas a constituir los futuros oocitos, se forman de células indiferenciadas y se disponen en cordones sexuales en la vida intrauterina. A principios del siglo XX se avanzó considerablemente en el conocimiento de las funciones del ovario y, además, se establecieron, y conocieron más profundamente, las relaciones entre el oocito y el desarrollo folicular (Brambelí, 1927 y Pincus, 1936). En esta época, Pincus y Enzmann (1935), fueron los pioneros en comparar el comportamiento de los oocitos *in vivo* e *in vitro*. Finalmente, se llega a las décadas de los años 1960 y 1970, caracterizadas por la gran cantidad de trabajos que estudian el metabolismo y los requerimientos bioquímicos del cultivo *in vitro* de oocitos en diversas especies animales Edwards, 1965; Brinster, 1967; Biggers, 1971; Donahue, 1972; Channing y Tsafriiri, 1977; Thibault et al., 1977; todos estos autores han sido revisados por Wassarman (1988).

3.4. Formación de los ovocitos

Las células germinales primordiales se originan a partir del endodermo del saco vitelino. Estas células proliferan y migran hacia las crestas genitales ubicadas en el mesonefros del embrión donde se diferencian en ovogonias y continúan proliferando formando grupos, los cuales son rodeados por células provenientes del mesonefros formando los cordones sexuales primitivos.

Durante la vida fetal, alrededor del día 80 de gestación en el bovino, las ovogonias comienzan a dejar su ciclo mitótico para entrar en la profase I de la meiosis, convirtiéndose en ovocitos primarios (Russe, 1983). La profase I de la meiosis se divide en cinco etapas: leptonema, cigonema, paquinema, diplonema y diacinesis. Durante el leptonema los cromosomas comienzan a condensarse formando filamentos delgados. Debido a que la meiosis se inicia después de un periodo de síntesis de ADN estos cromosomas contienen dos cromátidas hermanas. Durante el cigonema se inicia el apareamiento de los cromosomas homólogos y se forma el complejo sinaptonémico. Este apareamiento se completa en el paquinema, durante el cual también se produce la condensación y acortamiento de los cromosomas. En este período los cromosomas homólogos están íntimamente unidos formando tétradas (unidades bivalentes con cuatro cromátidas) y se produce el intercambio de segmentos entre las cromátidas homólogas, la recombinación. Durante el diplonema los cromosomas homólogos comienzan a separarse, aunque continúan unidos por uno o más quiasmas. En este punto la meiosis se arresta y los cromosomas se descondensan tomando un aspecto difuso que permite la síntesis de ARN.

En este estadio, también conocido como vesícula germinal (GV), la progresión de la meiosis es detenida y no será reiniciada hasta que el ovocito sea seleccionado para iniciar la etapa de maduración lo que puede ocurrir meses o años más tarde (Johnson et al., 2004).

3.4.1. Descripción del Oocito Maduro

3.4.1.1. Morfología del oocito inmaduro

El oocito, aislado de su folículo, presenta un núcleo grande, situado periféricamente, rodeado de la membrana nuclear y con un nucléolo apenas visible, en los oocitos bovinos (Hyttel P, 1987).

Este estado nuclear se corresponde con el estadio de dictiatio meiótico (GV).

Los orgánulos citoplásmicos se distribuyen por todo el citoplasma de la célula y así las mitocondrias se localizan en la periferia, mientras que en posición central se encuentran gránulos corticales, retículo endoplásmico rugoso (REr), aparato de Golgi y vesículas lisosomales (Kruip et al., 1983).

El espacio perivitelino (EPV) no existe o es muy pequeño y la zona pelúcida se encuentra atravesada por las prolongaciones de las células de la corona radiada, constituyéndose como uniones intercelulares (“gap junctions”). Estas uniones llegan incluso hasta el interior del oocito y sirven como “puente” de unión entre éste y las células del cúmulo que le rodean, también entre ellas mismas. Estas vías de comunicación celular pueden ocupar la superficie total de la membrana plasmática del ovocito (Moor y Gandolfi, 1987).

El ovocito inmaduro presenta el cúmulo celular compacto e incluso dificulta la visión del propio oocito (Leibfried y First, 1979).

3.5. Maduración del Ovocito

La LH estimula la producción de factores similares a EGF en las células de la granulosa murales que transmiten la señal en forma paracrina y/o yuxtacrina a las células de la granulosa del cumulus desencadenando, a través de diferentes vías metabólicas, el inicio de la maduración (Conti et al., 2006).

3.5.1. Maduración nuclear

Es un proceso necesario para que le ovocito reduzca su carga cromosómica,

convirtiéndose en haploide, y así, una vez fecundado por un espermatozoide, pueda dar lugar a un cigoto diploide y viable (Palma et al., 1993).

El ovocito sufre su primera división meiótica con la expulsión del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino. El ovocito, que ahora se denomina un ovocito secundario, comienza la segunda división meiótica hasta llegar a metafase I. La segunda división meiótica se completa con la penetración del espermatozoide al óvulo lo cual es acompañado por la expulsión del segundo corpúsculo polar en el espacio perivitelino. El ovocito en esta etapa contiene el número haploide de cromosomas (Gordon, 2003).

La maduración se puede dividir en dos eventos separados, la maduración nuclear y la citoplasmática, aunque ambos eventos ocurren simultáneamente y en forma interconectada.

3.5.2. Maduración citoplasmática

Los cambios citoplásmicos no se completan hasta las 30 horas de haber comenzado la maduración, aunque nuclearmente la maduración finaliza a las 24 horas (Hyttel, 1987). Estos cambios citoplásmicos incluyen, sobre todo, dos procesos: la colocación de los gránulos corticales a la periferia, situándose bajo la membrana plasmática (Ducibella *et al.*, 1988), y el agrupamiento de mitocondrias y RER en cisternas de gran tamaño. En esta fase final de la maduración, sigue existiendo una alta actividad de síntesis proteica con el fin de preparar al oocito, nuclear y citoplásmicamente, para la fecundación (Moor y Gandolfy, 1987).

Aunque los cambios nucleares pueden ser claramente observados en el ovocito, existen otros cambios, a nivel del citoplasma y de las superficies del ovocito, que son mucho menos evidentes y muy importantes para el éxito de la fecundación y desarrollo embrionario (Palma et al., 1993).

La maduración citoplasmática es considerada como un conjunto de procesos por el cual el ovocito se convierte en una célula capaz de ser fecundado y poder soportar el desarrollo embrionario. La maduración citoplasmática es necesaria para la obtención

de condiciones de bloqueo de la polispermia, para descondensar el núcleo del espermatozoide y formar el pronúcleo masculino después de la fecundación. (Chaves et al., 2010).

3.5.3. Morfología del oocito maduro

Se caracteriza por la expansión total del cúmulo celular y por la presencia del primer corpúsculo polar en el EPV (Leibfried y First, 1979). A nivel nuclear, los cromosomas presentan la configuración de metafase II.

Estos fenómenos cronológicos, descritos en la maduración se corresponden tanto en los oocitos madurados *in vivo* como *in vitro* (Kruip et al., 1983). Las diferencias más notables entre ambos tipos de maduración, estriban fundamentalmente en que los oocitos madurados *in vitro* sufren, por un lado, un retraso en la migración de los gránulos corticales a la periferia del oocito (Hyttel et al., 1987) y por otro, presentan un mayor número de prolongaciones celulares, provenientes de las células de la corona radiada, en el EPV.

Por lo tanto, los criterios que aseguran que ha ocurrido la maduración *in vitro* pueden resumirse en:

- 1) Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II.
- 2) Expansión y mucificación del cúmulo celular.
- 3) Traslado de los gránulos corticales a la periferia del oocito (Ducibella *et al.*, 1988).
- 4) Desaparición de las uniones intercelulares.

Aunque estos criterios de maduración son aceptados por la mayoría de los autores, todos ellos están de acuerdo en que el mejor criterio de una correcta maduración es comprobar la capacidad del oocito para ser fecundado y seguir su desarrollo embrionario de una manera completamente normal (Hyttel et al., 1987).

3.6. Maduración *in vitro* de ovocitos bovinos

La maduración *in vitro* de los ovocitos requiere el cumplimiento de los siguientes pasos: la recolección de los ovarios en el matadero, obtención de ovocitos, selección de los ovocitos y maduración *in vitro* de los ovocitos.

3.6.1. Recolección de Ovarios del Matadero

Se consiguen de vacas sacrificadas en matadero. Todos los autores están de acuerdo en que su obtención debe realizarse inmediatamente después de la muerte del animal, siendo habitual hacerlo dentro de los 30 minutos siguientes al sacrificio (Leibfried y First, 1979 y 1987; Fukui y Sakuma, 1980; Hyttel et al., 1987; Sirard et al., 1987 y 1988; Gordon, 1990; Fukui, 1990). La mayor parte de los autores no tienen en cuenta el ciclo estral del animal (Sirard et al., 1987 y 1988). El transporte se hace en soluciones salinas-tampón o fosfato-salinas (PBS) con antibióticos (Hyttel et al., 1987). Además, Moor y Crosby (1986) y First y Parrish (1988), manifiestan la importancia de la temperatura de transporte, ya que por debajo de 30°C está comprometida la capacidad de maduración *in vitro*. Por otro lado, el tiempo que transcurre, desde la recogida de los ovarios hasta el cultivo de los oocitos, debe oscilar entre 2 y 5 horas (Katska y Smorag, 1984; First y Parrish, 1988), aunque (Yang et al., 1990), indican que después de ocho horas desde la recogida de los ovarios todavía se puede conseguir la maduración *in vitro*, siempre y cuando los ovarios se mantengan por encima de 24°C.

Por otro lado, la edad óptima del animal para obtener oocitos, con vistas a su maduración *in vitro*, no está bien determinada, ya que hay autores que señalan las mismas posibilidades de maduración para los oocitos provenientes de terneras, novillas o vacas adultas desde 3 años en adelante (Katska y Smorag, 1984). Sin embargo, la mayoría de los autores prefieren ovarios provenientes de novillas, puesto que las posibilidades de encontrar folículos atrésicos y oocitos degenerados son significativamente menores que en vacas de más edad (Gordon, 1990).

3.6.2. Selección del folículo

Según Motlik, Fulka y Flechon (1986), los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de oocitos incompetentes o bien atrésicos, mientras que los mayores de 10 mm presentan un mayor número de oocitos degenerados (Fukui y Sakuma, 1980). Por ello, la mayoría de los autores seleccionan folículos antrales, de diámetros comprendidos entre 2 y 8 mm.

Por otro lado, Lonnergan et al., (1992) señalan que los folículos, con un diámetro de entre 2 y 6 mm, permiten una tasa de recuperación de oocitos (N° de oocitos obtenidos/N° de folículos aspirados) aptos para el cultivo mayor que en los folículos de mayor tamaño.

Wurth y Kruip (1992) señalan que los oocitos, procedentes de folículos ligeramente atrésicos, tienen una capacidad normal para madurar *in vitro*, siempre que el cúmulo y el citoplasma no presenten signos claros de degeneración.

Por otra parte, Gandolfi et al., (1997) informan que la morfología de los ovarios, puede ser utilizada como método efectivo de preselección de los ovocitos. Este estudio clasifica a los ovarios en tres categorías de acuerdo a la cantidad y tamaño de los folículos. Así tenemos:

Categoría 1.- ovarios con 1 folículo mayor a 10 mm de diámetro.

Categoría 2.- ovarios con presencia de 10 folículos de 2 a 5 mm de diámetro y ausencia de 1 folículo de 10 mm de diámetro.

Categoría 3.- ovarios con presencia de menos de 10 folículos de 2 a 5 mm de diámetro y ausencia de 1 folículo de 10 mm de diámetro.

Los resultados indican que los ovarios de las categorías 1 y 2 contienen ovocitos que forman mayor proporción de blastocitos, después de ser madurados y fertilizados *in vitro*.

3.6.3. Obtención de los Ovocitos

El método más común, para obtener oocitos foliculares inmaduros, es la aspiración del contenido folicular, mediante punción de los folículos seleccionados, utilizando para ello agujas estériles, de 18 a 21 G, conectadas a jeringas estériles de 10 ml (Iritani y Niwa, 1977; Xu y Greve, 1988). Otros autores han recogido los oocitos mediante la disección y subsiguiente ruptura de los folículos intactos (Moor y Trounson, 1971; Lu et al., 1987, 1988).

Aunque según Arloito et al., (1990) los oocitos de folículos que no están situados en la superficie ovárica tienen menores posibilidades de madurar *in vitro*.

El producto de la aspiración se introduce en un tubo cónico para que sedimenten los oocitos o en placas Petri de donde se obtienen. Posteriormente, se pasan varias veces por placas de lavado con objeto de eliminar elementos foliculares, que impiden o dificultan la maduración (líquido folicular, células de descamación, sangre, adherencias etc.) (Sirard et al., 1988).

3.6.4. Selección y Clasificación de los Ovocitos

La morfología que presentan los ovocitos obtenidos 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 cúmulus que lo envuelven.

En el año 1979, Leibfried y First proponen el siguiente esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus.

De acuerdo a la apariencia de las células del cúmulus los ovocitos se pueden clasificar en cuatro categorías:

Categoría 1.- Presentan tres capas compactas de células del cúmulus que los rodean en toda su superficie.

Categoría 2.- Se presentan rodeados parcialmente por tres capas compactas de células del cúmulus.

Categoría 3.- Se encuentran rodeados por células del cúmulus expandidas.

Categoría 4.- Ovocitos desnudos.

3.7. Medios de Cultivo

Para la maduración *in vitro* de los ovocitos se utilizan 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 de sus componentes. A pesar de la amplia variedad de medios descrita, el más utilizado es el TCM-199 (Gliedt et al., 1996).

Rose y Bavister (1992) realizan un estudio en el que comparan diferentes medios de cultivo comerciales. Los medios comparados fueron Ham's F-12, TCM-199, MEM y Waymouth's MB 752/1. Los resultados demuestran que la utilización de TCM-199 o MEM permiten obtener un mayor grado de fertilización, en comparación con los medios Ham's F-12 y Waymouth's MB 752/1.

El medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) tamponado con bicarbonato y suplementado con diversos sueros y/o gonadotrofinas y/o esteroides ha sido el medio de cultivo más utilizado para el estudio de la maduración de ovocitos (Gordon, 2003).

3.7.1 Suplementación de los medios de cultivo

El medio de maduración de los ovocitos, es suplementado con suero fetal bovino (SFB), suero de vaca en celo (SVC) o albúmina sérica bovina (BSA). Estos elementos, favorecen la expansión de las células del cúmulus y la producción de diversos factores que promueven el reinicio de la meiosis granulosa (Fukui y Sakuma, 1980)

La suplementación del medio de cultivo con albumina sérica bovina, suero fetal bovino o suero de vaca en celo ha demostrado mejorar la maduración de ovocitos y el desarrollo posterior del embrión. Estos sueros contienen hormonas factores de crecimiento, aminoácidos y proteínas.

El uso de suero fetal bovino se ha utilizado como la principal fuente de proteínas en los estudios de maduración de ovocitos (Gordon, 2003).

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.

Uno de los mecanismos por los cuales la adición de la hormona LH a los medios de cultivo, favorece la tasa de ovocitos madurados *in vitro*, es el incremento de la energía disponible para el ovocito en el medio ambiente de cultivo (Brackett y Zuelke, 1993).

3.7.2 Reguladores de la maduración *in vitro*

Las hormonas y el sistema del Adenosín mono fosfato cíclico (AMPC), entre otros factores, participan activamente en el control de la maduración del oocito, tanto *in vivo* como *in vitro* (Fukui y Ono, 1989).

3.7.3 Hormonas que participan en el desarrollo folicular

3.7.3.1 Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)

El hipotálamo es el órgano encargado de convertir las señales neurológicas originadas en estímulos externos e internos en descargas hormonales. Uno de sus productos es la hormona GnRH. Luego de ser secretada es acumulada en la eminencia media hasta que se produce la despolarización neuronal.

Como respuesta al estímulo adecuado, la GnRH entra a capilares fenestrados y llega a la hipófisis vía vasos portales. Según los pulsos liberados se secreta como respuesta FSH o LH (Gigli et al., 2006).

3.7.3.2. Hormona folículo estimulante (FSH)

La FSH es necesaria para el reclutamiento de folículos antrales. Las células de la teca interna de los folículos terciarios responden al estímulo de la FSH produciendo andrógenos y estimulando la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa y transformando a los andrógenos en estradiol.

La FSH también está involucrada en el aumento de la vascularización del folículo dominante. El aumento de la irrigación permite una mayor obtención de nutrientes permitiendo el desarrollo de los folículos ováricos. Bajo la influencia de la FSH, las células de la granulosa se dividen por mitosis incrementando las capas que rodean al ovocito y aumentan el tamaño folicular. La FSH junto con el estradiol estimula la formación de la cavidad antral y la expresión de receptores para LH en las células de la granulosa del folículo preovulatorio. La FSH también cumple un rol en el proceso de ovulación al estimular la secreción del activador del plasminógeno por parte de las células de la granulosa (Gigli et al., 2006).

3.7.3.3. Hormona luteinizante (LH)

La función de la LH es reiniciar la meiosis en el folículo preovulatorio, desencadenar la ovulación y controlar el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo (CL). Ejerce su acción uniéndose a receptores de membrana en las células de la granulosa y tecales del folículo preovulatorio (Gigli et al., 2006).

En el animal vivo, el pico de LH en las primeras horas del celo es la señal para el inicio de la maduración nuclear y citoplasmática, que puede ser observado 4-8 horas después de ese evento (Gordon, 2003).

El pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) comienza alrededor de 24 horas antes de la ovulación en la mayoría de las especies domesticas e inicia los cambios foliculares que alteran su condición endocrina y producen la liberación del ovocito (Cunningham, 2003)

3.7.4. La GnRH y la LH en la maduración *in vitro* de ovocitos

3.7.4.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

Se ha demostrado que la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) puede estimular la maduración de ovocitos en rata (Hillensjo y Marie 1980).

En un estudio realizado en Venezuela la GnRH adicionado al medio de maduración de ovocitos bovinos incrementa la tasa de fertilización y división embrionaria *in vitro* comparado al grupo control (Fernández, 1997).

3.7.4.2. Hormona luteinizante (LH)

La hormona luteinizante mejora la maduración de los ovocitos inmaduros obtenidos de animales sacrificados esto se refleja en las elevadas proporciones de ovocitos fertilizados (Zuelke y bracketf, 1990). Si bien pueden madurar ovocitos *in vitro* de forma espontánea o adicionando otras hormonas, la adición de LH al medio de cultivo aumenta en 3 veces el número de ovocitos maduros de rata (Shalgi, 1979).

La LH es esencial para la maduración meiótica de los ovocitos y la ovulación en la vaca. La acción de la LH sobre sus células diana es mediante la unión a receptores específicos de la membrana celular. Aunque no hay receptores de la LH en la superficie de los ovocitos, pueden encontrarse en las células somáticas del ovocito (Gordon, 2004).

3.7.5. Condiciones de cultivo *in vitro*

En un principio, los medios de maduración se basaban en soluciones salinas simples a las que se añadían diversas sustancias con el objetivo de imitar, en todo lo posible, las condiciones a las que el oocito está expuesto en el líquido folicular. Por otro lado, en los sistemas de maduración *in vitro*, también es necesario controlar las condiciones fisicoquímicas del medio, fundamentalmente en lo referente a la temperatura, osmolaridad, pH, atmósfera gaseosa y duración del cultivo *in vitro*.

3.7.5.1. Temperatura

Katska y Smorag (1983) indican que la maduración de oocitos bovinos no se produce 5 °C por debajo de la temperatura corporal normal de la especie. Por otro lado, márgenes de temperatura entre 37 y 41 °C, permiten la maduración *in vitro* de los oocitos bovinos (Lenz et al., 1983), aunque la temperatura óptima es de 39 °C, coincidiendo con la temperatura corporal de la especie (Lenz et al., 1983).

3.7.5.2. Osmolaridad

La presión osmótica que puede soportar el oocito en los medios de maduración, oscila entre 265 y 325 mOsM. La mayoría de los medios utilizados tienen osmolaridades de 285-295 mOsM, aunque Sato et al., (1977) indicaron que los oocitos porcinos y bovinos podían madurar, incluso, con valores de 316-350 mOsM.

3.7.5.3. PH

Mantener el pH del medio constante y a niveles fisiológicos es un factor decisivo, ya que muchos sistemas enzimáticos del oocito bovino sólo actúan a pH muy limitado, inhibiéndose su actividad por debajo de pH 6,7 y por encima de pH 7,6. El pH se regula, en el medio de maduración, gracias a la concentración de CO₂ y de bicarbonato sódico. La variación de pH soportable, en los medios de maduración, oscila entre 6,8 y 7,4, estableciéndose el pH óptimo en 7,2 - 7,4 (Sato et al., 1977).

3.7.5.4. Atmosfera Gaseosa

La composición de la atmósfera gaseosa en el incubador, se considera importante, en el control del pH intra y extracelular y por ende las funciones metabólicas de las células en cultivo (Bavister, 1987).

Por ello habitualmente se emplean mezclas de gases a diferentes concentraciones 5% de CO₂ en el aire, o bien, 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ (Lu et al., 1987).

3.7.5.5. Duración de cultivo *in vitro*

Durante la maduración *in vitro*, la ruptura de la vesícula germinal y el comienzo de la maduración nuclear se produce desde las tres horas de cultivo, a pesar de algunas discrepancias la expulsión del primer corpúsculo polar ocurre a las 18 -24 horas después del inicio de la maduración. En Irlanda se investigó el efecto de la duración de la maduración *in vitro* (16-32h) sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos para una calidad óptima, se concluyó que la maduración *in vitro* debe llevarse a cabo durante 24 horas (Gordon, 2003).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización

La investigación se realizó en el laboratorio de criopreservación de semen de la Estación Experimental de Choquenaira dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés. Se encuentra ubicado geográficamente entre los paralelos 16°42'5" de latitud sur y 68°15'15" de longitud oeste y una altitud de 3870 msnm., a 32 km sur - oeste de la ciudad de La Paz y a 6 km de la población de Viacha.



Figura 3. Estación Experimental de Choquenaira.



Figura 4. Localización de la Estación experimental de Choquenaira

4.2. Características Generales de la Estación Experimental de Choquenaira

4.2.1. Fisiografía

El aspecto fisiográfico de la región, está dada aproximadamente en un 21% por serranías y 79% de planicies que constituye la cuenca lechera y forrajera, que son aptos para la producción de cultivos agrícolas y las crianzas de animales mayores y menores, la vegetación corresponde a Bosque Húmedo Montano Sub-tropical, donde la vegetación primaria dominante son las plantas xerofíticas y mesofíticas, las especies más representativas que componen la comunidad vegetal son de tipo herbáceo anuales y plurianuales y algunos de tipo arbustivas (Mamani y Céspedes, 2012).

4.2.2. Vegetación

Las plantas que predominan en las praderas nativas son las gramíneas y otras especies de importancia forrajera que desarrollan de manera irregular en altura y poco volumen en masa, en estos campos existen el sobrepastoreo del ganado bovino, ovinos y camélidos.

4.2.3. Suelos

La estación tiene una superficie de 160 has, de las cuales el 25% son tierras cultivables, 20% son medianamente cultivables por factores de suelo y clima y el 40% son improductivas por la alta humedad del suelo (anegamiento en época de lluvias), el resto corresponde a la serranía y al pie de ella se encuentra las instalaciones de la Estación Experimental (Poma, 2014).

4.2.4. Características Climáticas

Las variables climáticas en la región del altiplano son muy cambiables. Realizada los análisis de datos climáticos entre los periodos 2005 – 2014 la temperatura promedio anual es 7,7 °C y las extremas fluctúan entre -15 a 22 °C.

Las precipitaciones son estacionales e irregulares en intensidad y periodicidad, en

los últimos años las precipitaciones se concentran en los meses de diciembre a marzo, alcanzando el 72 % de toda la precipitación.

La precipitación promedio llegó a alcanzar 485,2 mm entre los periodos 2005 – 2014 (Senamhi 2014).

4.3. Material experimental

4.3.1. Material Biológico Ovarios

Los ovarios fueron recuperados de vacas sacrificadas del matadero municipal Los Andes del municipio de El Alto, para la colecta de ovarios no se consideró el ciclo estral, la raza, la edad ni vacas en gestación.

Los ovocitos de bovinos fueron obtenidos a través del método punción y aspiración folicular de los ovarios que se realizó inmediatamente llegando al laboratorio.

4.3.2. Equipos de laboratorio

- Baño maría
- Microscopio
- Estereoscopio
- Balanza Analítica
- Centrifugadora
- Micropipetas
- Placa Térmica
- Refrigerador
- Incubadora Portátil

4.3.3. Materiales de laboratorio

- Agujas 18G
- Jeringas
- Pinzas
- Termo de transporte de ovarios
- Cajas Petri
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Termómetro
- Tijeras
- Gradillas
- Vaso Precipitado

4.3.4. Insumos

- Agua ultra pura
- Medio de cultivo sintético TCM-199
- Hormona LH
- Heparina
- Solución Buffer Fosfato Salino (PBS)
- Gonadotrofina Coriónica equina (eCG)

4.3.5. Otros materiales utilizados

- Líquido folicular
- Papel grueso
- Papel filtro
- Ligaduras
- Bolsas nylon 30x10 cm

4.3.6. Condiciones de Laboratorio

Las condiciones que se trabajó en laboratorio de criopreservación de semen en la Estación Experimental de Choquenaira fue a 20 – 25 °C de temperatura, la humedad relativa del laboratorio es del 60% y también se utilizaron dos lámparas ultravioletas para la eliminación de gérmenes.

4.4. Métodos

4.4.1. Recuperación de ovarios del matadero

La colecta de ovarios se realiza una vez que los animales pasaban por la sala de faena, luego pasaban por el sector de eviscerado, es donde se procedía a recoger los úteros de las vacas recién faenadas para luego con la ayuda de tijeras extraer los ovarios.

Los ovarios colectados se los pone en bolsas de polietileno de 10 x 35 cm, estas bolsas contiene suero fisiológico (0.9% Na Cl) más antibiótico, todo se los almacenaba en termos donde la temperatura en que se encontraba los ovarios en el termo es de 39 °C simulando la temperatura corporal de la vaca.

El suero fisiológico se la utiliza para quitar la sangre de los ovarios, así como también para evitar alguna contaminación en la extracción de los ovarios, con el suero fisiológico se lava los ovarios para sean completamente visibles los folículos ováricos.

4.4.1.1. Control de Temperatura

La temperatura es importante para la maduración de ovocitos es por eso que se mide la temperatura del termo al salir del matadero la cual oscila entre 40 – 41°C después de la colecta de los ovarios, también cuando esta se encontraba en camino al laboratorio y cuando llegaba al laboratorio con una temperatura de 37 – 39°C, para así no tener resultados inesperados por cambios de temperatura en el transporte de los ovarios.

4.4.1.2. Colección de Ovocitos

Los ovarios colectados del matadero una vez transportados al laboratorio se procede a tomar la temperatura del agua del termo para asegurarse que los ovarios no tuvieron un cambio brusco de temperatura (37 – 39°C).

Son extraídos de las bolsas para proceder al lavado con suero fisiológico más antibiótico previamente atemperado en baño maría a 38.5 °C retirando todas la impurezas y sangre de cada ovario, se procede a secar cada ovario con papel hasta que quede totalmente limpio y se pueda observar claramente los folículos que presenta cada ovario.

Para poder obtener los CCO's (complejo cumulus ovocitos) se realizó el método de aspiración el cual con una jeringa de 5 ml y agujas de 18 G se buscaba de cada ovario aquellos folículos que median más de 2 mm de diámetro para aspirar esos folículos y así obtener bueno ovocitos de categorías A, B, C y D.

Cada punción que se daba al folículo se aspiraba el líquido folicular más los ovocitos, esta aspiración de folículos se la vertía a tubos de ensayo que previamente están atemperados en baño maría a 38.5 °C, dejando reposar toda la concentración aspirada en los tubos de ensayo por un lapso de 10 – 20 minutos, esto con el fin de

que por gravedad se sedimenta en la superficie del tubo de ensayo los ovocitos.

El líquido folicular que ya no tiene impurezas ni CCO's flotando en el tubo de ensayo es extraído con jeringas de 5 ml para posteriormente desecharlo.

La sedimentación que se quedaba en la parte inferior del tubo de ensayo es vaciada a cajas Petri para proceder al primer lavado de los CCO's con (PBS).

Una vez que se lavó los ovocitos esta se las lleva al estereoscopio para realizar la separación de las impurezas y ovocitos.

Los ovocitos que se observa en el estereoscopio son aspirados cuidadosamente con micropipetas, las cuales son llevadas a otras cajas Petri que contienen 3.5 ml de (PBS) para realizar el siguiente lavado de ovocitos dejando atrás aquellas impurezas que perjudican en la visibilidad y clasificación de los ovocitos.

4.4.1.3. Método Selección y Clasificación de ovocitos

Para la selección de los ovocitos en las cajas Petri se observa aquellos ovocitos que tenían capas de células del cumulus, citoplasma completa, núcleo bien definido.

Para la clasificación de ovocitos se tomó en cuenta las recomendaciones de (Leibfried y First, 1979).

4.4.2. Método de maduración *in vitro*

4.4.2.1. Preparación de Materiales y Acondicionamiento

Se acondicionó un envase tipo tapper rectangular de plástico con un volumen de 500 ml, adaptado por Suzuki et al., (1999).

El envase utilizado cuenta con características de seguridad que no permite el ingreso y salida de líquidos, ni aire, esto gracias a la silicona que cuenta la tapa y a los seguros que tiene en cada lado del envase brindando un buen agarre de seguridad.

La tapa del envase se acondiciono introduciendo en uno de los extremos una goma, que fue adherida con pegamento especial, al medio de esta goma fue introducida

una aguja 18 G que esta se conecta a una ligadura de 15 cm de largo esto con el fin de controlar la salida de oxígeno y dar ingreso a la adición de agua destilada para obtener CO₂ controlando la ligadura con pinzas hemostáticas que sirven como válvulas.

El tapper contiene una caja Petri 60 x 15 mm que dentro de ella contiene 4 gotas de aproximadamente 100µl del medio de maduración cubiertas con aceite mineral.

Una vez tapado el envase se procedió a extraer 25 ml de aire del interior del tapper, se aseguró con la pinza hemostática la ligadura acondicionada al envase, el CO₂ requerido (5%) se obtuvo por adición de 5 ml de agua destilada a 0,25 g de granulo efervescente dentro de un pequeño envase de plástico el cual liberaba CO₂ dentro de la incubadora portable.

4.4.3. Preparación del medio de Maduración

4.4.3.1 Líquido Folicular más Hormona LH

Para realizar el medio de maduración con líquido folicular se procede a extraer de los tubos de ensayos el líquido folicular aspirado de los folículos de los ovarios, este líquido es vaciado a alícuotas de 1.5 ml donde es llevado a la centrifugadora y que por un lapso de 15 minutos a 3500 RPM es centrifugado.

Después del centrifugado trasladar a nuevas alícuotas limpias y esterilizadas poniendo a 1 ml por alícuota llevar estas a congelación.

Cada alícuota que se descongela para usar en la maduración *in vitro* de ovocitos debe tener de 1 ml de líquido folicular esta complementar con 10 µl de Hormona LH + 1 µl de Heparina, agitar toda la mezcla suavemente.

Luego procedemos a medir el pH de este medio el cual debe estar entre 6.9 y 7.3 para que sea óptimo para la maduración *in vitro*.

Las alícuotas con líquido folicular + Hormona LH + Heparina poner a la placa térmica durante 20 – 30 minutos antes de iniciar la maduración *in vitro* para que el medio de

maduración tenga 38.5 °C de temperatura.

4.4.3.2. Medio sintético TCM-199

Para la preparación del medio sintético es necesario contar con todos los materiales previamente esterilizado.

Pesar en una balanza analítica TCM 0.302 gr esta mesclar con 20 ml agua ultra pura, agitar suavemente hasta que se disuelva totalmente.

Medir el PH y estandarizar hasta obtener 7.1 - 7.4. La estandarización se la realiza con hidróxido de sodio.

Pasar la solución de TCM-199 estandarizada a alícuotas de 1 ml y congelar la solución hasta su utilización.

Para proceder a la mezcla se debe descongelar 1 ml de TCM-199 se debe añadir 4 µl de gonadotropina coriónica equina (Novormon) + 10 µl de Hormona LH.

Las alícuotas de TCM-199 que se encuentran en congelación pasar a la placa térmica durante 15 - 20 minutos para que se descógele y se atempere a 38.5 °C para su uso en la maduración de ovocitos.

4.4.4. Maduración de ovocitos

Los ovocitos seleccionados para la maduración que se encuentran en las cajas Petri con PBS son lavados 3 a 4 veces para la eliminación de impurezas y cumulus rotos de ovocitos que se desintegraron en los folículos ováricos.

Luego del lavado de los CCO's estas son separadas por categorías en otras cajas Petri que contiene PBS para poder notar cambios después de la maduración, cada caja Petri con PBS debe estar en la palca térmica atemperada a 38.5 °C, esto para que los ovocitos seleccionados no sufran alteraciones de temperatura.

Una vez que se tiene el medio de maduración listo, atemperado y mesclado con las hormonas se puede depositar gotas en las cajas Petri teniendo un aproximado de

100 µl por gota, cubiertas con aceite mineral, todo este proceso se trabaja en la placa térmica a 38.5 °C de temperatura.

Los ovocitos seleccionados que se encuentran en las cajas Petri con PBS son llevados cuidadosamente con las micropipetas a las gotas de maduración, la caja Petri que contiene el medio de maduración más los ovocitos es introducido al tapper.

El medio del tapper fue acondicionado a 38,5°C con 5% de CO₂, siguiendo el procedimiento de preparación de materiales y acondicionamiento.

Para finalizar este proceso el tapper es introducido a baño maría a 38.5°C durante 24 horas.

4.4.5. Evaluación Morfológica de la Maduración

La evaluación de maduración de ovocitos se procede a realizar pasada las 24 horas, se extrae el tapper del baño maría e inmediatamente una vez que se abre el tapper se extrae la caja Petri donde se encuentran los ovocitos estos son llevados a la placa térmica para que esta siga en temperatura de 38.5 °C, la evaluación se realizó tomando en cuenta los criterios que aseguran que ha ocurrido la maduración *in vitro* (Ducibella et al., 1988).

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

4.4.5.1. Evaluación porcentaje de Recuperación de Ovocitos

La evaluación en el porcentaje de recuperación de los ovocitos se realizó contando todos los ovocitos que fueron aspirados usando la técnica punción y aspiración, se seleccionó las categorías (A, B, C y D), para la clasificación y evaluación de ovocitos se tomó en cuenta las recomendaciones de (Leibfried y First, 1979), también se observó y se contó aquellos ovocitos que presentaban deficiencias, como ser: cumulus celular incompleto, zona pelucida rota o sin contenido citoplasmático y

degeneración en algunas partes del citoplasma.

4.5. Análisis Estadístico

Los datos que se obtuvo en la maduración *in vitro* de ovocitos fueron analizados en un Diseño Completamente Aleatorio (D.C.A) Bi Factorial, tomando en cuenta las categorías (A, B, C y D) y los medios de maduración de ovocitos

(Líquido Folicular con Hormona LH, Líquido Folicular sin Hormona (Testigo) y medio de maduración sintético TCM-199).

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

X_{ij} = Porcentaje de Maduración de ovocitos.

μ = Media de los medios de maduración de ovocitos.

α_i = Morfología de ovocitos (A, B, C y D).

β_j = Los medios de maduración de ovocitos (Líquido Folicular con Hormona LH, medio de maduración sintético TCM-199 y Líquido Folicular sin Hormona (Testigo)).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Interacción morfológica de ovocitos * medios de maduración de ovocitos.

ϵ_{ij} = Error experimental.

Para el porcentaje de recuperación de ovocitos se utilizó el modelo Diseño Completamente Aleatorio donde tomamos en cuenta la técnica de Recuperación de ovocitos (Punción y Aspiración), sobre las categorías de ovocitos (A, B, C y D).

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

X_{ij} = Porcentaje de recuperación de ovocitos.

μ = Media de los ovocitos recuperados.

α_i = Morfología de ovocitos (A, B, C y D).

E_{ij} = Error experimental.

Para las demás variables de respuesta como maduración nuclear, número de ovocitos por vaca, número de folículos por ovario, tamaño de folículo y Líquido Folicular, se sacaron medias y porcentajes.

4.6. Variables de Respuesta

- Porcentaje de Maduración de Ovocitos
- Porcentaje de Maduración Nuclear
- Porcentaje de Recuperación de Ovocitos
- Número de folículos por Ovario
- Número de Ovocitos por Vaca
- Tamaño Folicular
- Cantidad de Líquido Folicular

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Porcentaje de Maduración de Ovocitos

Cuadro 1. Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	P >0,05
Categoría	0,03	3	0,01	0,27	0, 8496
Medios	0,44	2	0,22	5,27	0,0063
Categoría * Medios	0,57	6	0,09	2,26	0,0411
Error	5,51	132	0,04		
Total	6,56	143			

5.1.1. Categoría de Ovocitos

En cuanto a categorías en el análisis de varianza, se pudo evidenciar que los resultados son No Significativos, el cual nos indica que no existe diferencias estadísticas en cuanto a las categorías (A, B, C y D), en la maduración *in vitro* de ovocitos.

5.1.2. Medios de cultivo

En los medios de maduración de ovocitos se obtuvo diferencias Altamente Significativas, el cual nos indica que si tenemos diferencias estadísticas en cuanto al porcentaje de maduración de ovocitos cuando utilizamos los medios de maduración (Líquido Folicular Con Hormona LH, Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo) y TCM-199).

5.1.3. Interacción Medios de cultivo por Categoría de Ovocitos

Para la interacción medios de maduración de ovocitos con respecto a las categorías de ovocitos se puede evidenciar que si tenemos diferencias estadísticas, cuando utilizamos los medios de maduración (Líquido Folicular Con Hormona LH, Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo) y TCM-199) con respecto a las categorías de ovocitos (A, B, C y D), obteniendo resultados Significativos.

5.1.4. Coeficiente de Variación (C.V.) en la maduración de ovocitos

Cuadro 2. Coeficiente de Variación (C.V.)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Porcentaje de Maduración de Ovocitos	144	0,16	0,09	11,56%

Según el coeficiente de variación en la investigación realizada en el porcentaje de maduración de ovocitos fue: “Muy Bueno” según los valores de coeficiente de variación de Ramiro Ochoa, (2016) obteniéndose un coeficiente de variación de 11,56%.

5.1.5. Prueba de Medias para Medios de Maduración de Ovocitos

Cuadro 3. Prueba de medias Test: Duncan

Alfa=0,05

Error: 0,0418 gl: 132

Medios	Medias	n	E.E.	
Medio TCM-199	1,85	48	0,03	A
Medio Liquido Folicular Con Hormona LH	1,73	48	0,03	B
Medio Liquido Folicular Sin Hormona (Testigo)	1,73	48	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Se puede observar que tenemos diferencias estadísticamente significativas en los medios de maduración de letra A con los de letra B ya que el mejor tratamiento es el medio sintético TCM-199 que llegó a alcanzar un porcentaje de maduración del 44,73%, con respecto a los medios de maduración de letra B que son estadísticamente similares con el Medio Liquido Folicular Con Hormona LH se llegó a alcanzar un porcentaje de maduración del 31,71% y con el Medio Liquido Folicular Sin Hormona (Testigo), solo alcanzo un 30,77% de maduración de ovocitos (Grafico 1).

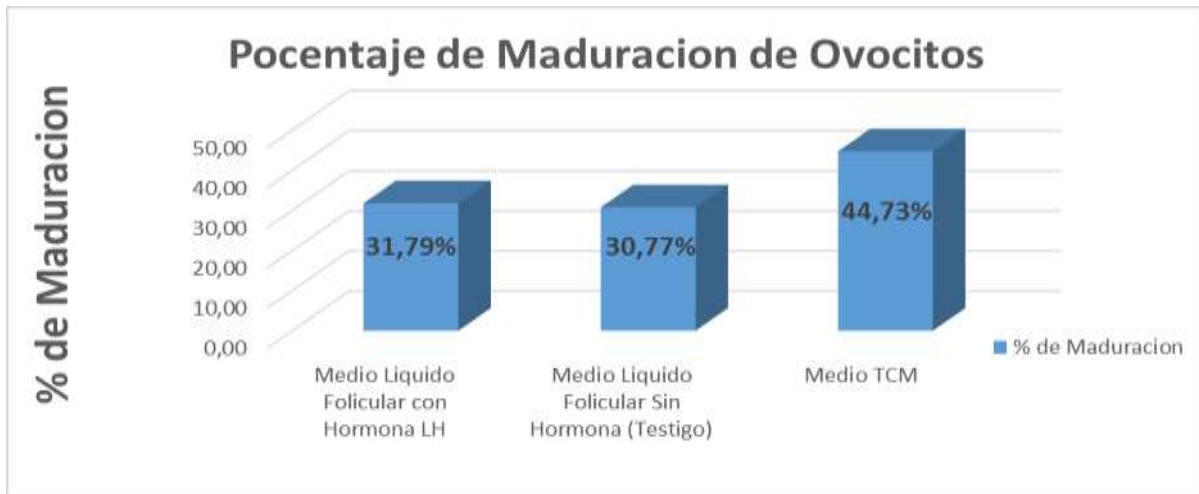


Grafico1. Porcentaje de maduración de ovocitos con tres medios de maduración de ovocitos.

El resultado obtenido en la investigación es inferior, ya que se logró 44,73% de maduración de ovocitos utilizando el medio de cultivo sintético TCM-199 suplementado por hormona Luteinizante (LH) y GnRH (eCG), también atribuimos que utilizó mayor cantidad de ovocitos en el estudio de Fernández et al., 2010, donde recupero 670 ovocitos por punción y aspiración, los ovarios fueron obtenidos en mataderos, los cuales se cultivaron en medio TCM-199. De 302 ovocitos recuperados por punción y aspiración, 97 maduraron representando 32.1% de maduración de ovocitos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la investigación, con 44,73% de maduración de ovocitos, son superiores a los resultados encontrados por (Gonzales et al., 2005), donde utilizo bolsas gasificadas que contenían en su interior 5% CO₂, 95% N₂ y 5% O₂, que fueron sumergidas dentro de un sistema de incubación bajo el agua (baño María) a 38,5 °C utilizando como medios para la maduración de ovocitos TCM-199 adicionado con 15% de SFB, eCG y hCG se obtuvo una tasa de maduración del 39.8%.

Según el trabajo realizado por (Rea et al., 2001) en La Paz Bolivia sobre la maduración y fertilización de ovocitos a partir de ovarios recolectados del matadero, procedentes del altiplano de La Paz y los llanos del Beni. Donde solamente utilizo los

ovocitos con calidad morfológica I y II. Fueron cultivados en un medio que contenía 100 μ L de TCM-199 suplementada con 15% de suero de vaca en estro, 0,5 μ g/ml de FSH, 0,5 μ g/ml de LH, 10 μ L de piruvato de sodio y 187 μ L/ml de lactato de sodio. Obtuvieron para las vacas del Beni un 36% de ovocitos en metafase II, significativamente mayor al 24% de ovocitos maduros de vacas de La Paz, en la investigación realizada en la localidad de La Paz en el altiplano boliviano se obtuvo mejores porcentajes de maduración de ovocitos llegando al 44,73%, siendo mejores que de los llanos del Beni y La paz en años pasados, en esta investigación se tomó en cuenta todas las categorías, desde ovocitos desnudos categoría D, hasta ovocitos que cuentan más de 5 capas de cumulus (categoría A).

Otro resultado reportado por Zuelke y Braccket (1990), en su estudio realizado en Grecia, han demostrado que la hormona luteinizante mejora la maduración de ovocitos obtenidos de animales sacrificados y cual se vio reflejado en la elevada proporción de ovocitos madurados y fertilizados. El efecto positivo de la LH se verificó durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos (37,5% en TCM-199 vs 73,5% en TCM-199 + LH) con respecto a los niveles de LH obtuvieron mejores resultados cuando se adicionaron 50 y 100 μ g/ml en el medio de cultivo. Estos resultados comparados con los obtenidos en esta investigación son inferiores esto deducimos que es por la cantidad de proporción de hormona luteinizante añadida al medio de maduración TCM-199 ya que se obtuvo un 44,73% de maduración de ovocitos utilizando el mismo medio.

5.1.6. Prueba de medias en la Interacción Medios de cultivo por Categorías de ovocitos

Cuadro 4. Prueba de medias Test: Duncan

Alfa=0,05

Error: 0,0418 gl: 132

Categoría	Medios	Medias	n	E.E.
A	Medio TCM	1,88	12	0,06 A
B	Medio TCM	1,88	12	0,06 A
D	Medio TCM	1,86	12	0,06 A
C	Medio Líquido Folicular Con Hormona	1,82	12	0,06 A B
B	Medio Líquido Folicular Con Hormona	1,80	12	0,06 A B
D	Medio Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo)	1,79	12	0,06 A B
C	Medio TCM	1,77	12	0,06 A B C
A	Medio Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo)	1,77	12	0,06 A B C
D	Medio Líquido Folicular Con Hormona	1,71	12	0,06 A B C
C	Medio Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo)	1,69	12	0,06 A B C
B	Medio Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo)	1,66	12	0,06 B C
A	Medio Líquido Folicular Con Hormona	1,60	12	0,06 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En la interacción de los factores Medios de Maduración por Categoría de Ovocitos se tiene diferencias estadísticas notables, teniendo como mejor resultado en la interacción el medio de maduración TCM-199 con las categorías de ovocitos A, B y D alcanzando 49,51%, 47,59% y 44,67% respectivamente.

Los medios de maduración y categoría de ovocitos que siguen a los mejores resultados son medio Líquido Folicular Con Hormona de las categorías de ovocitos C y B con un 43,61% y 42,44%. También está el medio Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo) con la categoría de ovocitos D teniendo un 40,97%.

Seguido del medio de maduración TCM-199 de categoría de ovocito C que alcanzo 37,15%, el medio de maduración Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo) de las categorías de ovocitos A y C alcanzaron 35,00%, 27,08% respectivamente, y el medio Líquido Folicular Con Hormona de categoría D de ovocitos se obtuvo solo un 28,37%.

El medio de maduración Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo) de categoría de ovocito B alcanzo un resultado menor, llegando alcanzar 20,02%.

El último medio de maduración que obtuvo el menor porcentaje con respecto a los demás medios de maduración de ovocitos y categorías de ovocitos, fue el medio Líquido Folicular con Hormona LH de categoría A llegando a alcanzar un 12,78%.

5.2. Maduración Nuclear

Cuadro 5. Maduración Nuclear de Ovocitos

Medio de Maduración de Ovocitos	Nº de Ovocitos Evaluados en laboratorio	Nº de Ovocitos Seleccionados de categoría A	Nº de Ovocitos que Llegaron a Maduración Nuclear	Porcentaje de Maduración Nuclear (%)
Líquido Folicular Con Hormona LH	180	47	7	14,89%
Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo)		60	10	16,67%
TCM-199		73	26	35,62%

Fuente Elaboracion Propia.

En la investigación se trabajo con 724 ovocitos distribuidos por categorías de ovocitos (A, B, C y D), se seleccióno 180 ovocitos de categoría A, para evaluar con los distitos medios de maduracion y conocer cual es el mejor medio de maduracion de ovocitos para hacer alacanzar la maduracion nuclear (Grafico 2).

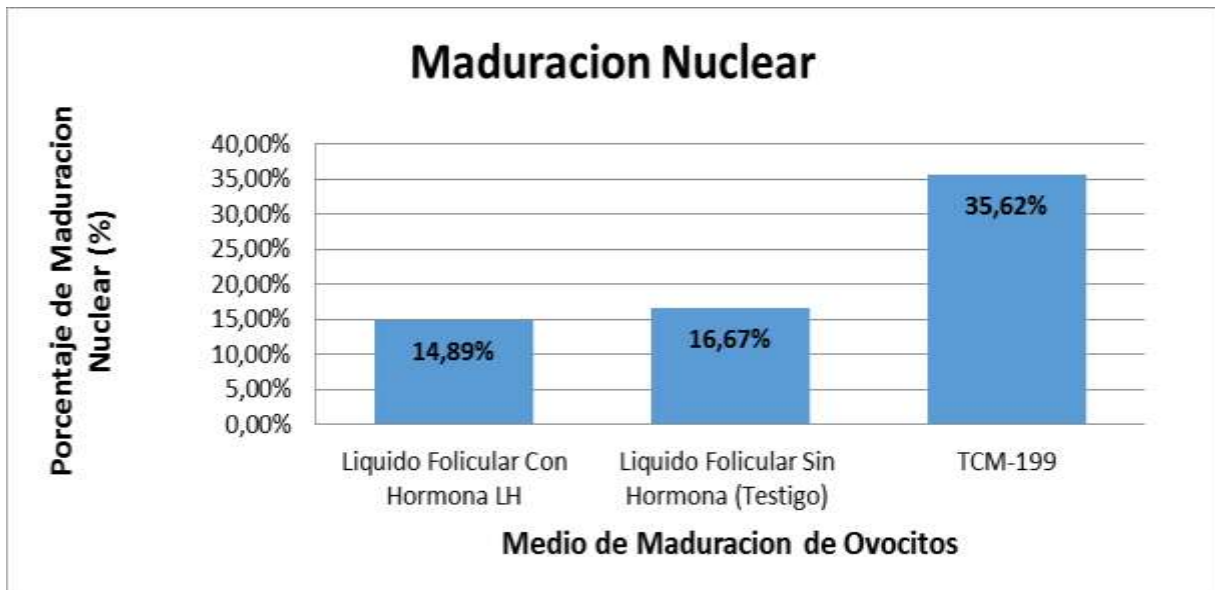


Grafico 2. Porcentaje de Maduración Nuclear de ovocitos.

Para la Maduración nuclear en este estudio obtuvimos resultados donde se encuentra diferencia entre los medios de maduración de ovocitos, el mejor medio de maduración que hizo llegar a una maduración nuclear de ovocitos, fue el medio sintético TCM-199 suplementado con Hormonas LH y GnRH (eCG), llevo a alcanzar un porcentaje del 35.62%, seguido del medio Líquido folicular Sin Hormona (Testigo) llegando a obtener 16,67% y el ultimo medio líquido Folicular Con Hormona LH solo obtuvo un porcentaje de 14,86% de maduración nuclear de ovocitos.

El estudio realizado por (Salgado et al., 2010) en Montería, Colombia, se evaluó el efecto de las hormonas FSH y LH sobre la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos, donde el medio de maduración base fue TCM-199 suplementado con FSH y LH. Demostraron que la FSH o LH sola o en combinación inducen altas tasas de maduración de ovocitos bovinos *in vitro* ya que en ausencia de las

gonadotropinas solo el 36,43% alcanzo la maduración nuclear lo cual indica la importancia de estas hormonas para una adecuada maduración, las mayores tasas de maduración *in vitro* fueron alcanzados cuando el medio de maduración contenía una mayor proporción de LH 150 µg/ml y 50 µ/ml de FSH, este resultado en el porcentaje de maduración nuclear de ovocitos, es ligeramente mayor en el presente estudio donde nosotros utilizamos 10 µl de LH y de 4 µl de GnRH (eCG) y obtuvimos 35.62%, esto lo atribuimos a que se utilizó mayores proporciones de cantidad de hormonas LH y GnRH (eCG) en las proporciones del medio de maduración sintético TCM-199.

Según Chura (2011), los porcentajes de maduración corresponden a todos los ovocitos que muestran el primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino después de 24 horas de maduración *in vitro*. Los resultados son TCM-199 + GnRH y se obtuvo un 20% y TCM-199 + LH el resultado fue de 28% de Ovocitos maduros, en la investigación realizada obtuvimos mejores resultados llegando a un 32,72% de maduración nuclear de ovocitos debido a que se suplemento al medio de maduración sintético TCM-199 hormona LH y GnRH (eCG), además se llegó a la maduración nuclear de ovocitos, tomando en cuenta todas las categorías desde la categoría D que no posee capas del cumulus, hasta aquellos mejores ovocitos de categoría A que posee más de 5 capas de cumulus.

5.3. Porcentaje de Recuperación de Ovocitos

Cuadro 6. Análisis de la Varianza

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>P >0,05</u>
Categoría	0,02	3	0,01	1,20	0,3695
Error	0,05	8	0,01		
<u>Total</u>	<u>0,07</u>	<u>11</u>			

5.3.1. Categoría de Ovocitos

Para las categorías de ovocitos (A, B, C y D) en el análisis de varianza se puede evidenciar que los resultados son No Significativos, esto nos indica que no existen diferencias estadísticas en el porcentaje de recuperación de ovocitos en las

categorías (A, B, C y D), utilizando la técnica de Punción y Aspiración.

5.3.2. Prueba de Medias de Categoría de Ovocitos

Cuadro 7. Prueba de Medias Test: Duncan

Alfa=0,05

Error: 0, 0058 gl: 8

Categoría	Medias	n	E.E.
B	1,52	3	0,04 A
C	1,50	3	0,04 A
A	1,46	3	0,04 A
D	1,41	3	0,04 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Según la prueba de medias Duncan no se encuentra diferencias estadísticas en las categorías (A, B, C, y D) de ovocitos utilizando el método de Punción y Aspiración lo que significa que con esta técnica de recuperación de ovocitos la categoría no es influenciada en la recuperación de ovocitos.

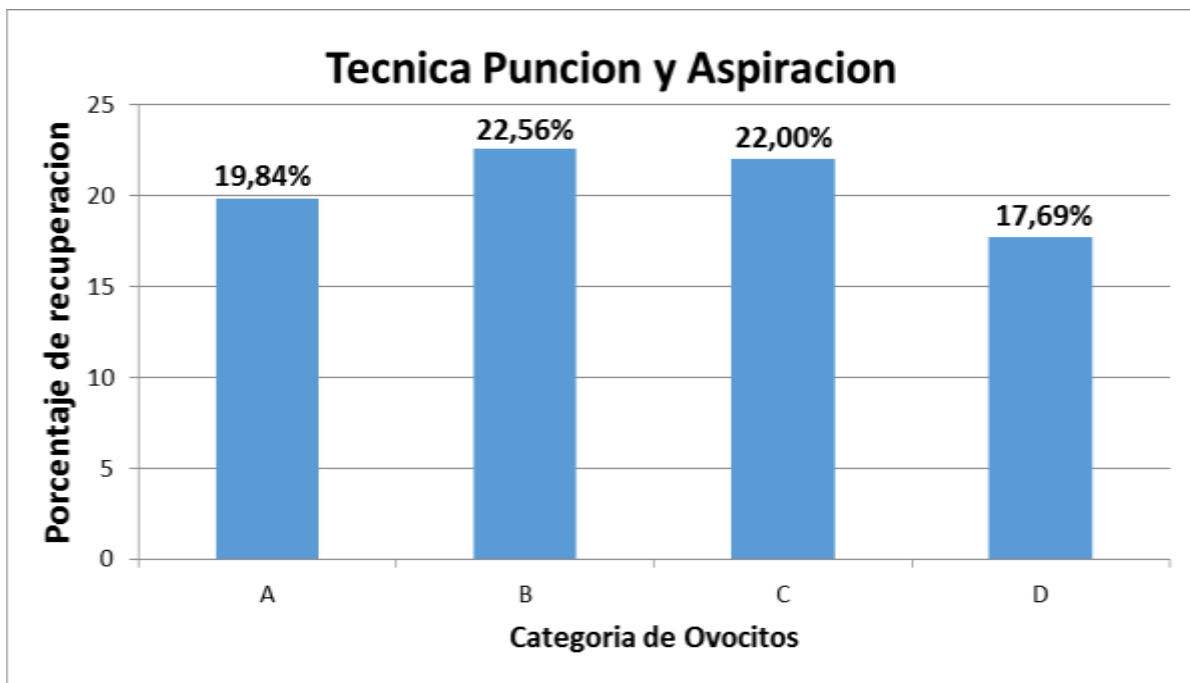


Grafico 3. Porcentaje de recuperacion de ovocitos según categoría.

Como se puede observar en la grafica la mayor cantidad de ovocitos que se recolecto con la tecnica puncion y aspiracion fue la categoria B que se llevo a recolectar 22,56% el cual representa 199 ovocitos, seguido de la categoria C que se alcanzo a coleccionar 22,00% teniendo 194 ovocitos, con menor porcentaje llegamos a recuperar 19,84% de categoria A recuperando 175 ovocitos y se solo se pudo coleccionar 17,69% de ovocitos de categoria D evaluando solo 156 ovocitos. (Grafico 3).

5.3.3. Coeficiente de Variación (C.V.) del porcentaje de recuperación de ovocitos

Cuadro 8. Coeficiente de Variación (C.V.)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Recuperación de Ovocitos	12	0,31	0,05	5,19

Según el coeficiente de variación en la investigación realizada en el porcentaje de recuperación de ovocitos observando las categorías (A, B, C y D) de ovocitos, utilizando el método de Punción y Aspiración fue: “Excelente” según Ramiro Ochoa (2016), obteniéndose un coeficiente de variación de 5,19%.

Cuadro 9. Detalle del número de ovocitos trabajados y encontrados.

Nº de Ovarios	Nº de Ovocitos Recuperados	Categoría de ovocitos	Nº de Ovocitos evaluados	Nº Ovocitos recuperados no evaluados	Porcentaje de Ovocitos Evaluados (%)	Porcentaje de Ovocitos Recuperados No Evaluados (%)
538	882	A	175	41	19,84%	4,65%
		B	199	35	22,56%	3,97%
		C	194	38	22,00%	4,31%
		D	156	44	17,69%	4,99%
Sub Total			724	158	82,09%	17,91%
Total			882		100%	

Fuente: Elaboración Propia

De todos los ovocitos recuperados y clasificados se observó las características y aspectos del citoplasma, se contó el número de capas que rodean al ovocito para

poder separar a las distintas categorías de ovocitos (A, B, C y D), se pudo obtener un porcentaje de recuperación del 82,09% el cual representa 724 ovocitos los cuales fueron evaluados, la recuperación de ovocitos se utilizó la técnica punción y aspiración, el resto de ovocitos aspirados que cuenta con 17,91% el cual representa 158 ovocitos, no fueron evaluados por distintas características como ser: cumulus celular incompleto, zona pelucida rota o sin contenido citoplasmático, ovocitos vacuolizados, degeneración en algunas partes del citoplasma (Cuadro 9).

Según Rizos A. (2007), la recolección de oocitos que provienen de animales (jóvenes, vacas productoras de leche, vacas de carne) permiten incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora/año obtenidos por procedimientos in vitro, y los que mejores resultados que se tienen es por punción aspiración con 84 % y 38 %, sin embargo comparando con los resultados de nuestro estudio se tiene una similitud teniendo 82,09% de recuperación de ovocitos utilizando la técnica de punción y aspiración, los cuales fueron clasificados y evaluados por cada categoría ovacitoria que presenta las células del cumulus.

Al respecto Lonergan et al., (1991) y Herlerr et. al., (1992), indican que en mejores condiciones recolectando ovocitos por aspiración de folículos se puede alcanzar porcentajes cercanos al 70%. Con respecto a la investigación realizada en la recuperación de ovocitos, se alcanzó un 82,09%, este resultado obtenido se debe a que se utilizó y realizo correctamente la técnica punción y aspiración para la recolección de ovocitos.

Sin embargo, en nuestra experiencia realizada en el presente estudio se obtuvo mayores resultados que Fukui y Sakuma (1980) y Katska (1984) que obtuvieron 54,3% y 43,2% respectivamente, en esta investigación se obtuvo 82,09% en la recuperación de ovocitos utilizando la técnica punción y aspiración.

5.4. Numero de folículos/Ovario

Cuadro 10. Resumen de recuperación de ovocitos

Nº de Vacas	Nº de Ovarios	Nº de Folículos Aspirados	Promedio de Nº de Folículo / ovario	Nº de Ovocitos Recuperados	Nº de Ovocitos/Vaca	Nº de Ovocitos/Ovario
269	538	6354	11,81	882	3,28	1,64

Fuente Elaboración propia.

En la presente investigación realizada se obtuvo un promedio de 11,81 folículos/ovario, este resultado que se obtuvo es superior a (Pavlov et al., 1992), que obtuvo un promedio de 6,3 folículos/ovario, aunque, también es ligeramente inferior a los trabajos realizados por Lonergan et al., (1991) que obtuvo 14,6 folículos/ovarios. La mayoría de los estudios realizados indican que existe una variabilidad de folículos por ovario, esta variación de folículos es probablemente debido a la procedencia del animal, la edad y a las condiciones que presentan los animales a la hora del sacrificio.

5.5. Número de Ovocitos/Vaca

En esta investigación obtuvimos 3.28 ovocitos por vaca siendo inferiores al de Rea et al., (2001) donde hace referencia que obtuvieron 12,1 ovocitos por vaca, también en otro estudio realizado por Gordon (2003), quien indica que se obtiene una media de 14,3 ovocitos por vaca y 15 ovocitos por vaca obtenido por Palma et al., (1993), las causas de este bajo resultado en nuestro estudio en el número de ovocitos por vaca probablemente son porque en el estudio realizado no se consideró las condiciones físicas, ciclo estral y alimentación del animal, tampoco la edad de la vaca cuando se realizó la colecta de ovarios del matadero.

Según Gordon (2003) indica que los ovocitos procedentes de vaquillas y animales pre-púberes están relacionados con una menor capacidad de desarrollo *in vitro* que los procedentes de los animales adultos, en nuestra experiencia cuando realizamos la colecta de los ovarios pudimos observar que el sacrificio de los animales vacunos se la realizaba de cualquier edad tanto como animales jóvenes y como vacas adultas probablemente pueda ser una de las causas el cual se obtuvo menor número de ovocitos/vaca.

Adamiak et al., (2005) realizaron estudios donde indican que la condición corporal y el nivel de alimentación de la vaca donante influyen en una serie de factores que regulan el desarrollo folicular ovárico, la proliferación de las células de la granulosa y la esteroidogénesis, del mismo modo los altos niveles de alimentación también tienen un efecto perjudicial sobre la calidad de los ovocitos con bajas tasas de fertilización en ovinos y vacunos, en cuanto al presente estudio, realizamos la colecta de ovarios del matadero no se pudo saber la procedencia y tampoco la condición alimenticia en la que se encontraba la vaca sacrificada, el cual puede ser otro factor que afecta en el número de ovocitos/vaca obtenidos en esta investigación.

5.6. Tamaño de los folículos del ovario

Cuadro 11. Detalle de tamaño y liquido folicular en el ovario.

Tamaño Folicular (mm)	Cantidad de Líquido Folicular (ml)
8 mm	0,2 ml
9 mm	0,3 ml
10 mm	0,4 ml
11 mm	0,4 ml
12 mm	0,5 ml
13 mm	0,6 ml
14 mm	0,8 ml
15 mm	0,8 ml
16 mm	0,8 ml
17 mm	1,3 ml
18 mm	1,4 ml
19 mm	5,5 ml
22 mm	4,2 ml
23 mm	2,0 ml
25 mm	4,4 ml
30 mm	4,4 ml
35 mm	19,0 ml

Fuente Elaboración Propia.

En el cuadro se puede apreciar las medidas de los diámetros foliculares y la cantidad de líquido folicular que contiene los ovarios. Con los resultados que se obtuvo podemos decir que a mayor tamaño de los folículos se tiene mayor cantidad de líquido folicular la medida de los folículos se realizó desde 1mm que es el folículo más pequeño, hasta aquellos folículos más grandes que alcanzaron a medir 35 mm de diámetro folicular, los folículos de 1mm hasta los folículos de 7mm de diámetro se obtuvo 0 ml de líquido folicular.

La cantidad de líquido folicular son medias que se obtuvo midiendo los diámetros de los folículos (Grafico 4).

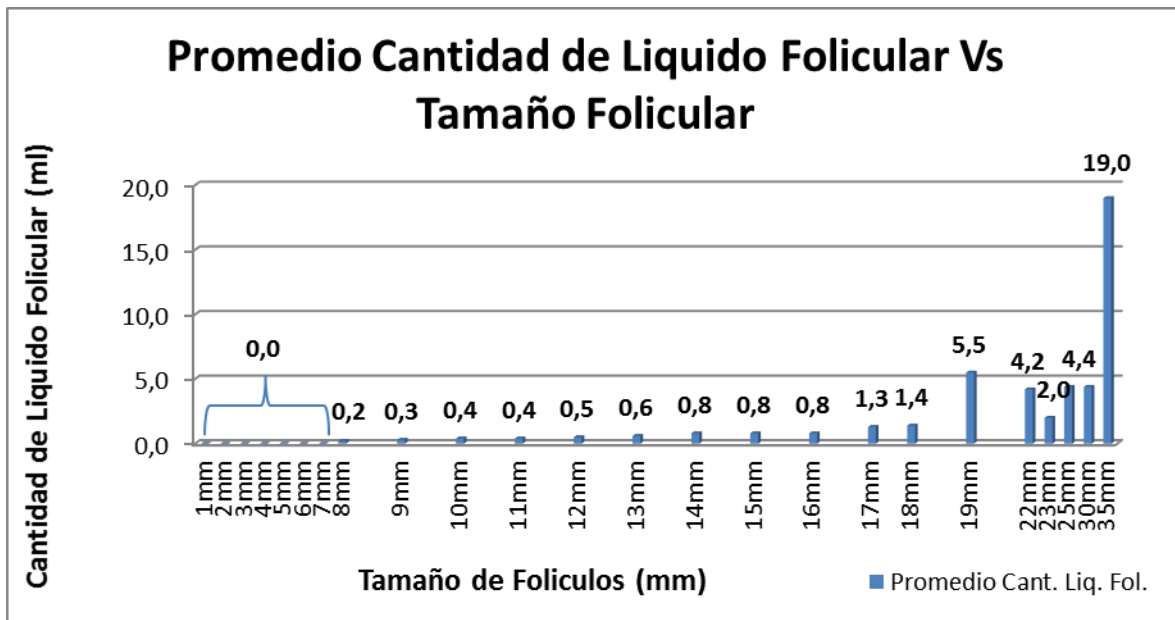


Gráfico 4. Cantidad de líquido folicular en los folículos de los ovarios.

(Lonergan et al, 1994) Indica que el tamaño de los folículos está directamente relacionado con la capacidad de desarrollo ya que un mayor porcentaje de ovocitos obtenidos de folículos mayores de 6 mm son capaces de dar origen a embriones en comparación con los obtenidos de folículos de entre 2 y 6 mm. Midiendo los ovocitos encontramos que a mayor tamaño de folículos tenemos mayor líquido folicular es por eso que tenemos más probabilidad de encontrar ovocitos capaces de dar origen a nuevos embriones, en la investigación se evaluó el diámetro de los folículos y se pudo evidenciar que a partir de 8 mm de folículo encontramos aproximadamente 0.2 ml de líquido folicular el cual este líquido mantendrá al ovocito con los requerimientos que necesita para madurar en el folículo del ovario, mientras que en un diámetro inferior a 7 mm no encontraremos líquido folicular el cual solo se encontrara ovocitos con deficiencias y mal formaciones estos ovocitos no serán aptos para una selección de maduración *in vitro*.

5.7 Costos de Producción Maduración *in vitro*Cuadro 12. Costos de producción en la Maduración *in vitro* de ovocitos

DESCRIPCIÓN	UNIDAD	CANTIDAD	PRESIO UNITARIO	COSTO TOTAL
A. LIMPIEZA DE LABORATORIO				59
Detergente	ml	1	12	12
Toalla	cm	3	5	15
Algodón	gr	2	16	32
B. INSUMOS Y MATERIALES				2351,2
B.1. INSUMOS				1372,8
Agua ultra pura	ml	1	30	30
Medio de cultivo TCM-199	gr	1	600	600
Hormona LH	ml	1	85	85
Líquido folicular	ml	-	-	-
Heparina	ml	1	45	45
Lavado de ovocitos PBS	ml	1	210	210
Gentamicina	ml	1	2,8	2,8
Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG o PMSG)	ml	1	400	400
B.2. Materiales de Laboratorio				978,4
Taper	ml	4	25	100
Agujas 18G	pza	1	25	25
Jeringas	pza	200	1	200
Pinzas	pza	3	35	105
Termo de transporte de ovarios	ml	1	40	40
Termo de transporte de agua para Baño	ml	1	55	55
Cajas Petri	pza	8	19,8	158,4
Tubos de ensayo	ml	6	2,5	15
Termómetro	pza	1	55	55
Tijeras	pza	2	35	70
Gradillas	pza	1	8	8
Vaso de precipitación	ml	2	45	90
Papel grueso	gr	4	10	40
Papel Filtro	gr	4	3	12
Ligaduras	pza	1	5	5
C. TRANSPORTE				846
Diario	bs	36	23,5	846
Costo total (A+B+C)				4234,6

Fuente Elaboración Propia

Detalle	Costo
Rendimiento de Ovocitos	3,28 ovocitos/vaca
Ovocitos Llegados a la Maduración Nuclear	43 ovocitos
Costo de Ovocito Maduro	96,16 bs/ovocito
Costo Total	4234,6 bs

Fuente Elaboración Propia

Cuadro 13. Detalle de resultados

5.7.1. Valor Bruto de Producción (VBP) = RDTO * COSTO DE OVOCITO

$$(VBP) = 3,28 * 96,16$$

$$(VBP) = 315,40 \text{ bs/ovocito}$$

5.7.2. Ingreso Bruto (IB) = (VBP) – (CT)

$$(IB) = 315.40 - 4234.6 \text{ bs}$$

$$(IB) = 3919.2 \text{ bs}$$

5.7.3. Beneficio Costo (B/C) = IB/CT

$$(B/C) = 3919.2/4234.6$$

$$(B/C) = 0.92 \text{ bs/ovocito}$$

5.7.4. Interpretación: Para la maduración *in vitro* de ovocitos, el costo beneficio es 0.92 bs/ovocito, este resultado nos indica que no es rentable la producción de ovocitos madurados, ya que por cada boliviano invertido solo recuperamos 0.92 bs. Este resultado se atribuye que es por la baja cantidad de ovocitos/vaca encontrados, probablemente por las edades de las vacas entre jóvenes y adultas, la alimentación de cada vaca, el ciclo estral en la que se encuentra u otras deficiencias fisiológicas que presentan las vacas cuando llegan al sacrificio.

6. CONCLUSIONES

En la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos realizados en condiciones de altura en la Estación Experimental de Choquenaira perteneciente a la Facultad de Agronomía se obtuvieron los siguientes resultados:

- En cuanto a la maduración *in vitro* al utilizar dispositivos no convencionales en laboratorio en condiciones de altura, utilizando dos medios de maduración de ovocitos se determinó que el mejor medio de maduración *in vitro* de ovocitos fue el medio sintético TCM-199 llegando a alcanzar 44,73% de maduración de ovocitos estos resultados son favorables a los resultados comparados que fueron reportados a nivel del mar.
- En la maduración de nuclear de ovocitos se obtuvo 35,62% utilizando el medio de maduración sintético TCM-199 estos porcentajes son menores e intermedios a la literatura citada.
- Se obtuvo un porcentaje de recuperación de ovocitos de un 82,09% utilizando la técnica Punción y Aspiración siendo mejores que los autores citados.
- En la clasificación morfológica de ovocitos se evaluó 175 ovocitos de categoría A, 199 ovocitos de categoría B, 194 ovocitos de categoría C y 156 ovocitos de categoría.
- El número de folículos por ovario como promedio obtuvimos 11,81 folículos por ovario, siendo intermedio a la literatura citada.
- Se obtuvo 3,28 ovocitos por vaca siendo un resultado inferior a los obtenidos por la literatura citada.
- Para el tamaño de los folículos se obtuvo diámetros foliculares que miden desde 1 milímetro de diámetros hasta folículos más grandes que alcanzan los 35 milímetros de diámetro folicular por ovario, siendo mayor tamaño el folículo mayor será la cantidad de líquido folicular encontrado en cada folículo.
- El costo beneficio es 0.92 bs/ovocito, este resultado indica que no es rentable la producción de ovocitos madurados *in vitro*.

7. RECOMENDACIONES

- Es importante realizar investigaciones de producción *in vitro*, más aún en el altiplano boliviano, aprovechando el potencial productivo de animales adaptados a la altura de este sector del altiplano del país, el cual nos ayuden a producir animales para potencializar en campo el efecto reproductivo de excelencia génica,
- Evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos después de las 24 horas hasta encontrar aquella hora que ayude a obtener un mejor porcentaje de maduración *in vitro* de ovocitos.
- Analizar distintitos niveles de TCM – 199 para obtener mayores porcentajes de maduración *in vitro* de ovocitos.
- Realizar investigaciones colectando ovarios de una sola raza de ganado vacuno, para posteriormente realizar comparaciones de que raza es más viable y cual se adecua mejor con la maduración *in vitro* de ovocitos en la altura.
- Trabajar con vacas sacrificadas que cuenten con una misma edad para saber con exactitud a que edad se puede recuperar mayor cantidad de ovocitos.
- Validar distintas técnicas de recuperación de ovocitos para incrementar el número de ovocitos recuperados.
- Se recomienda realizar estudios en cuanto a la calidad y cantidad de ovocitos recuperados por época y estación del año.
- Probar más medios sintéticos para evaluar cuál es más óptimo en la maduración *in vitro* de ovocitos en el altiplano boliviano.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adamiacks, J., Mackie, K., Wati, R. G., Webb, R., & Sinclair, K. D. (2005).** *Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle.* (Vol. 73). *Biology of reproduction.*
- Ahuja, A., Montiel, P., Pérez, H., & Gallegos, S. (2009).** *Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos* (Vol. 27). *Zootecnia Trop.*
- Arloito, T., M.L, L.-R., & First, N. (1990).** *Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two localities in the ovary.* (Vol. 33). *Theriogenology.*
- Bavister, B. D. (1987).** *Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. En: The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation in vitro.* . Plenum Press.
- Bespin, A., Rivero, I., & Morgado, A. (2007).** *Historia y uso de la inseminación artificial en la Agropecuaria "La Fundación"* (I Simposio ed.). Guárico: Tecnologías apropiadas para la ganadería de los llanos de Venezuela.
- Brackett, B. G., & Zuelke, K. A. (1993).** *Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos.* (Vol. 39). *Theriogenology.*
- Byskov, A., & Hoyer, P. (1994).** *Embriology of Mammalian Gonads and Ducts.* (E. Knobil, J. Neill, & et. al, Edits.) New York: The Physiology of Reproduction Raven Press.
- Camargo, Maldonado, A. D., Lizarazo, C., & Ortiz, Y. (2010).** *Anatomía de la hembra bovina, práctica sobre paso de sonda Foley, lavados uterinos y aspiración folicular en T.E.* Grupo tecnólogos reproducción bovina.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J., & Su, Y. (2006).** *Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles.* (Vol. 20). *Mol Endocrinol.*
- Cunningham, J. G. (2003).** *Fisiología Veterinaria* (tercera ed.). España: Elsevier.
-

-
- Chura, E. L. (2011).** *Evaluación y efecto de la GNRH y LH en la maduración y fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas brown swiss post mortem en la región de Puno.* Tacna, Peru.
- Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalbero, J., & Rangarajan, S. (1988).** *Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation.* *Devl. Biol.* 130.
- Dyce, K., Sack, W., Wensing, C., Rodriguez, E., & Camón, J. (2006).** *Anatomía Veterinaria* (Segunda ed.). México: McGraw- Hill Companies, INC.
- Edwards, R., Fowler, R., Gore-Langton, R., Gosden, R., Jones, E., Readhead, C., & Steptoe, P. (1977).** *Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries* (Vol. 51). *J Reprod Fertil.*
- Everett, J. (1994).** *Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview.* (E. Knobil, & J. Neill, Edits.) New York:Raven Press: The Physiology of Reproduction.
- Fernández, A. (1997).** *Fertilización in vitro de ovocitos recolectados de Vacas cebú postmortem.* *Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias.* (Vol. 5). Maracay, Venezuela: Archivo Latinoamericana de Producción Animal.
- Fernández, R. F., Hernández, P. J., & Reyes, F. M. (2010).** *Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos.* Recuperado el 14 de agosto de 2018, de <http://www.produccion-animal.com.ar>
- First, N. L., & Parrish, J. J. (1988).** *Sperm maturation and in vitro fertilization.* (Vol. 5). London: Proc. 11th Intern. Congr. Anim. Reprod. AI.
- Fukui, Y., & Ono, H. (1989).** *Effects of sera, hormones and of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes.* (Vol. 86). *J. Reprod. Fert.*
-

-
- Fukui, Y. (1990).** *Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro.* (Vol. 26). Mol. Rep. Dev.
- Fukui, Y., & Sakuma, Y. (1980).** *Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells.* (Vol. 22). Biol. Reprod.
- Gandolfi, F., Luciano, A. M., Modina, S., Ponzini, A., Pocar, O., Armstrong, D. T., & Lauria, A. (1997).** *The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary.* (Vol. 48). Theriogenology.
- Gázquez, A., & Blanco, A. (2004).** *Tratado de Histología Veterinaria.* Barcelona, España: Masson.
- Gigli, I., Russo, A., & Agüero, A. (2006).** *Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélido sudamericano.* (Vol. 8). Revista de investigación veterinaria.
- Gilchrist, R., Lane, M., & Thompson, J. (2008).** *Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality.* (Vol. 14). Human Reprod Update.
- Gliedt, D. W., Rosenkrans, C. F., Rorie, R. W., Munyon, A. L., Pierson, J. N., Miller, G. F., & Rakes, J. M. (1996).** *Effects of media, serum, oviductal cells, and hormones during maturation on bovine embryo development in vitro.* Journal Of Dairy Sciences.
- Gonzales, N., Huerta, L. M., Hoya, G. D., Espinosa, E., & Josa, A. (2005).** *Sistema de incubación en bolsas gaseadas: Alternativa al cultivo in vitro de embriones bovinos. Laboratorio de Biotecnología. Área de Obstetricia y Reproducción.*Zaragoza, España.
- Gordon, I. (1990).** *In vitro maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle ova.* (Vol. 8). Embryo Transfer Newsletter.

-
- Gordon, I. (2003).** *Laboratory production of cattle embryos* (Second ed.). (C. Publishing, Ed.) USA.
- Gordon, I. (2003).** *Laboratory production of cattle embryos*. (Second ed.). USA: CAB International Publishing.
- Gordon, I. (2004).** *Tecnología de la reproducción de los animales de granja*. España.: Acribia.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2005).** *Reproducción e inseminación artificial en animales* (Vol. 7). McGraw Hill.
- Hanada, A., Enya, V., & Suzuki, T. (1986).** *Proceedings of the 78th. Meeting of the Japanese* (Vols. 1-36). Society of Zootechnical Science.
- Herlerr, A., Lucas-Hann, A., & Ntemann, H. (1992).** *Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro production of bovine embryos*. *theriogenology* 37.
- Hillensjo, T., & Marie, W. (1980).** *Gonadotropin releasing hormona agonist stimulate meiotic maturation of follicle enclosed rat oocytes in vitro*. (Vol. vol. 287). Natura.
- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Conti, M. (2007).** *Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation*. (Vol. 27). Mol Cell Biol.
- Hyttel, P. (1987).** *Bovine cumulus-oocyte disconnection in vitro* (Vol. 176). Anat Embryol.
- Iritani, A., & Niwa, K. (1977).** *Capacitation of boíl spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture*. 1. (Vol. 50). Reprod. Pert.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J., & Tilly J, L. (2004).** *Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary*. (Vol. 428). Nature.

-
- Katska, L. (1984).** *Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle.* . Anim. Reprod. Sci.7.
- Katska, L., & Smorag, Z. (1983).** *The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes.* (Vol. 9). Anim. Reprod. Sci.
- Katska, L., & Smorag, Z. (1984).** *Number and quality of oocytes in relation to age of cattle* (Vol. 7). Anim. Reprod.
- Kruip, Th, A., Cran, D., Van Beneden, T., & Dieleman, S. (1983).** *Structural changes In bovine oocytes during final maturation in vitro.* (Vol. 8). Gamete Res.
- Lambert, R., Bernard, C., Rioux, J., Beland, R., D'amours, D., & Montreuil, A. (1983).** *Endoscopy in cattle by the paraloumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration.* Theriogenology 20.
- Leibfried, L., & First, N. (1979).** *Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro* (Vol. 48). J. Anim. Sci.
- Leibfried, L., & First, N. L. (1979).** *Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro* (J. Reprod. Fert. ed., Vol. 48).
- Lenz, R., Wall, G., Leibfried, M., AX, R., & First, N. (1983).** *In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes.* (Vol. 29). Biol. Reprod.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M., & I., G. (1994).** *Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro.* Mol Reprod Dev 37.
- Lonergan, P., Sharip, H., Monaghan, P., Wahid, H., Oallagher, M., & Gordon. (1992).** *Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture in vitro.* (Vol. 37). Theriogenology.

- Lonergan, P., Vergos, E. A., Kinis, H., Sharif, M., Gallagher, & I, G. (1991).** *The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for in vitro maturation.* Theriogenology.
- Lu, K., Gordon, Gallagher, M., & McGovern. (1987).** *Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro.* (Vol. 121). Vet. Rec.
- Machatkova, M., Jokesova, E., Petelikova, J., & Dvoracek, V. (1996).** *Competencia de desarrollo de embriones bovinos derivados de ovocitos recogidos en diversas etapas del ciclo estral.* Theriogenology.
- Mamani, F., & Céspedes, R. (2012).** *Revista en imágenes. Facultad de Agronomía. UMSA. La Paz.* (Primera ed.). D & M.
- McGee, E., & Hsueh, A. (2000).** *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles* (Vol. 21). Endocr Rev.
- Monforte, C. (2003).** *Congelación de embriones bovinos producidos in vitro* Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Centro de selección y reproducción animal, Gijón, Asturias.
- Moor, R., & Crosby, I. (1986).** *Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes.* (Vol. 94). Embryol. Exp. Morph.
- Moor, R., & Gandolfi, F. (1987).** *Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs* (Vol. 34). J. Reprod. Fertil. Suppl.
- Moor, R., & Trounson, A. (1971).** *Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent development capacity. 1.* (Vol. 49). Reprod. Fertil.
-

-
- Motlik, Fulka, & Flechon, J. (1986).** *Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro.* (Vol. 76). *Reprod. Pert.*
- Motta, P. (2012).** *Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina.*
- Palma, G., & et al. (1993).** *Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción.* Munich, Alemania.
- Pavlov, A., Lucas-Hann, A., & Niemann, H. (1992).** *Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles.* *Mol. Reprod. Dev.* 31.
- Perea, F. (2018).** *Tratamiento del anestro Postparto con progesterona Intravaginal mas ecg en vacas mestizas tropicales.* Recuperado el 12 de Mayo de 2018, de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27916/2/articulo6.pdf>.ISSN0798-2259.
- Poma Poma, I. B. (2014).** *Estudio del Comportamiento Hidráulico Relacionado a la Uniformidad de Aplicación Mediante el Método de Riego por Aspersión en la Estación Experimental de Choquenaira.* La Paz, Bolivia: Tesis de Grado Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía Universidad Mayor de San Andrés.
- Quintela, Diaz, L. C., Herradón, P., Peña, M., & Becerra, J. (2006).** *Ecografía y reproducción en la vaca.* Santiago de Compostela, España: Universidad de Santiago de Compostela.
- Rea, M., J., C., Olivares, J., & Cubillo, P. (2001).** *Obtención de embriones por maduración y fertilización in vitro de oocitos bovinos.* Instituto de genética. Universidad mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.
- Rose, T., & Bavister., B. (1992).** *Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos* (Vol. 31). *Mol. Reprod. Dev.*
-

-
- Russe, I. (1993). *Oogenesis in cattle and sheep* (Vol. 24). Bibl Anat.
- Salgado, R., Vergara, O., & Ramirez, L. (2010). *Efecto de las gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos cultivados in vitro.* (Vol. 15). Rev. MVZ .
- Sato, E., Iritani, A., & Nishikawa, Y. (1977). *Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured in vitro.* Sap. 5. (Vol. 23). Anim. Reprod.
- Shabankareh, H., & Zandi, M. (2010). *Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine* (Vol. 94). Fertil Steril.
- Shalgi, R. (1979). *The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro.* (Vol. 55). Journal of reproduction and fertility.
- Sirard, M. A., Ware, C. B., Leibfried-Rutledge, M. L., & First, N. L. (1988). *The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos.* (Vol. 39). Biol. Reprod.
- Sisson, S., Grossman, J., & Getty, R. (2005). *Anatomía de los animales domésticos* (Quinta en Español ed.). Barcelona, España: Masson S.A.
- Squires, E. J. (2003). *Applied animal endocrinology.* USA: CABI International Publishing.
- Stubbings, R. B., Armstrong, D. T., Beriault, R. A., & Basrur, P. K. (1988). *A method for aspirating bovine oocytes from small cesicular follicles: preliminary results.* (Vol. 29). Theriogenology.
- Suzuki, T., Sumantri, C., Khan, N., Murakami, & Saha, S. (1999). *Development of a simple, portable carbón dioxide incubator for in vitro production of bovine embryos.* (Vol. 53). Anim. Reprod. Sci.
- Torrez, R. O. (2016). *Diseños Experimentales* (Segunda ed.). La Paz, Bolivia
-

- Wassarman, P. (1988).** *me mammalian ovum. En: 'me Pitysiology of Reproduction'*.
New York: Rayen Press.
- Wurth, Y., & Kruip, T. (1992).** *Revine embryo production Lii visro after selection of die follicles and oocytes.* . 12 Internacional Congress on Animal Reproduction.
- Xu, K., & Greve, T. (1988).** *A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes.* 3. (Vol. 82). Reprod. fert.
- Yang, N., K.H, L., & Gordon. (1990).** *In vitro fertilization and culture of bovine oocytes from stored ovaries.* (Vol. 33). meriogenology.
- Yanguma, C. (2009).** *"Aparato reproductor de la hembra bovina"*.
- Zuelke, K. A., & Brackett, B. (1990).** *Luteinizing hormone enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation.* (Vol. 43). Biology of reproduction.

ANEXOS

ANEXO 1

Preparación de Medios

Solución Buffer Fosfato Salino (PBS) stock

Compuesto	500 ml
<hr/>	
Agua Ultra Pura.....	500 ml
Ca Cl.....	3.33 gr
K Cl.....	0.12 gr
Na HCO ₃	0.084 gr
Na H ₂ PO ₄ * H ₂ O.....	0.028 gr
Hepes.....	1.2 gr
Gentamicina.....	0.5 ml
Mg Cl ₂ * 6 H ₂ O.....	0.05 gr
Ca Cl ₂ * 2 H ₂ O.....	0.15 gr

Toda la solución ajustar el pH a 7.4. La solución debe permanecer bajo refrigeración dentro los 4 – 5 °C.

Medio de Maduración Líquido Folicular + LH + Heparina

Medio Líquido Folicular	1 ml
Líquido Folicular.....	1 ml
Hormona LH.....	10 µl
Heparina.....	1 µl

El líquido folicular centrifugado se puede almacenar hasta 2 semanas bajo congelación, el medio líquido folicular + LH + Heparina ajustar el pH a 7.3.

Medio de Maduración TCM

Medio TCM	20 ml
TCM.....	0.302 gr
Agua Ultra Pura.....	20 ml
(eCG o PMSG).....	80 µl
Hormona LH.....	1 µl

El medio TCM sin hormonas puede estar en congelación hasta por 1 mes, regular el pH hasta 7.4.

Regulador de pH

Regulador de pH	10 ml
Agua destilada.....	10 ml
Na OH.....	0.4 gr

La solución mantener en refrigeración de 4 – 5 °C.

ANEXO 2

Materiales y Equipos



Foto 1. Baño María utilizado como incubadora.



Foto 2. Dispositivo portátil de 500 ml (no convencional) para maduración.



Foto 3. Placa térmica.



Foto 4. Microscopio Electrónico.



Foto 5. Centrifugadora.



Foto 6. Balanza Electrónica.



Foto 7. Mufla Para la desinfección de Materiales.

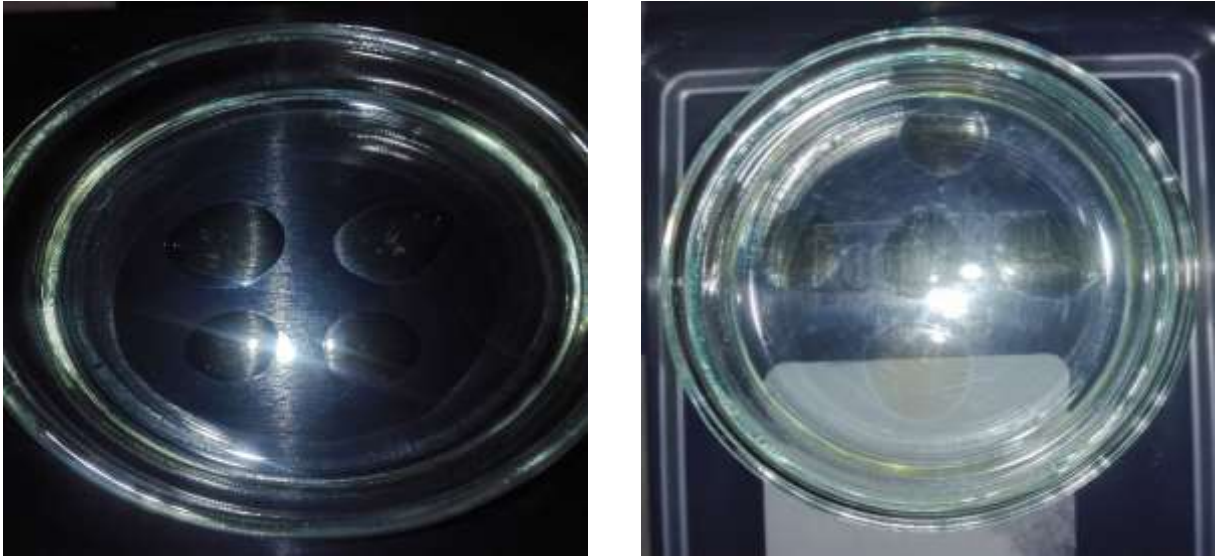


Foto 8. Cajas Petri con gotas de medio de Maduración cubiertas con aceite mineral.

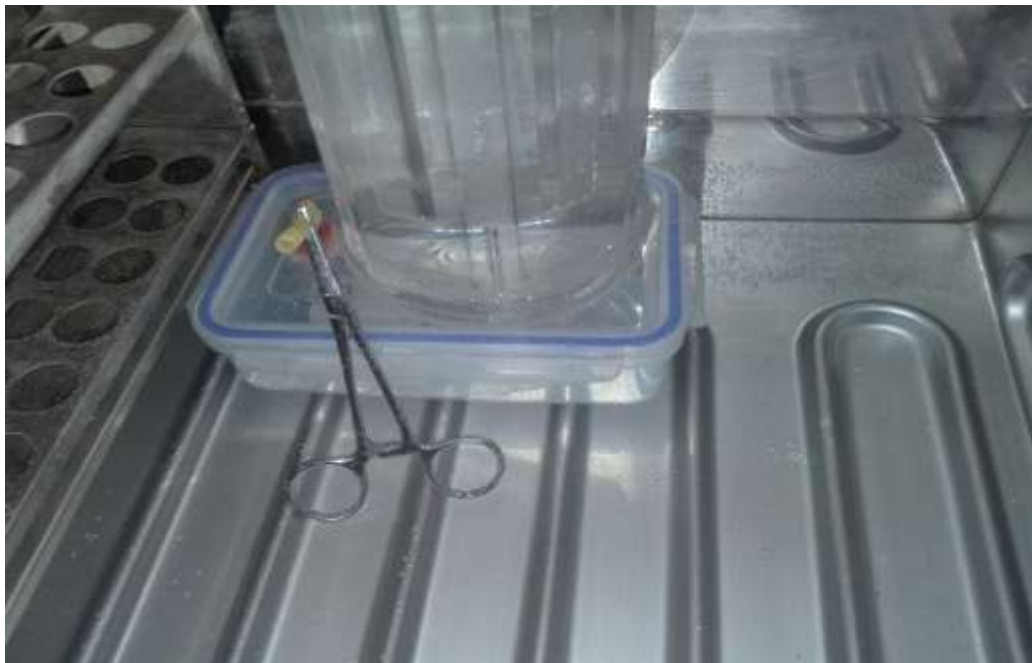


Foto 9. Dispositivo portátil dentro baño maría.



Foto 10. Micropipeta de 200 µl para la aspiración de Ovocitos y hormonas.



Foto 11. Refrigerador para la congelación de medios y materiales.



Foto 12. Ovarios con mas 3 mm de foliculos.



Foto 13. PH metro.

ANEXO 3

Maduración



Foto 14. Extracción de ovarios de los úteros de vacas recién sacrificadas.



Foto 15. Embolsado de Ovarios colectados en cloruro de sodio al 0.9 % más antibiótico de penicilina y estreptomicina.



Foto 16. Medición de la temperatura los termos en el transporte.



Foto 17. Estandarización de temperatura introduciéndolo a baño maría.



Folículos Antes y Después de la aspiración Folicular.



Foto 18. Aspiración folicular de los ovarios colectados y atemperados en baño maría.



Foto 19. Folículos aspirados de Ovarios colectados.



Foto 20. Asentamiento de ovocito a la parte inferior del tubo cónico.



Foto 21. Descongelación de medio de maduración en la placa térmica.

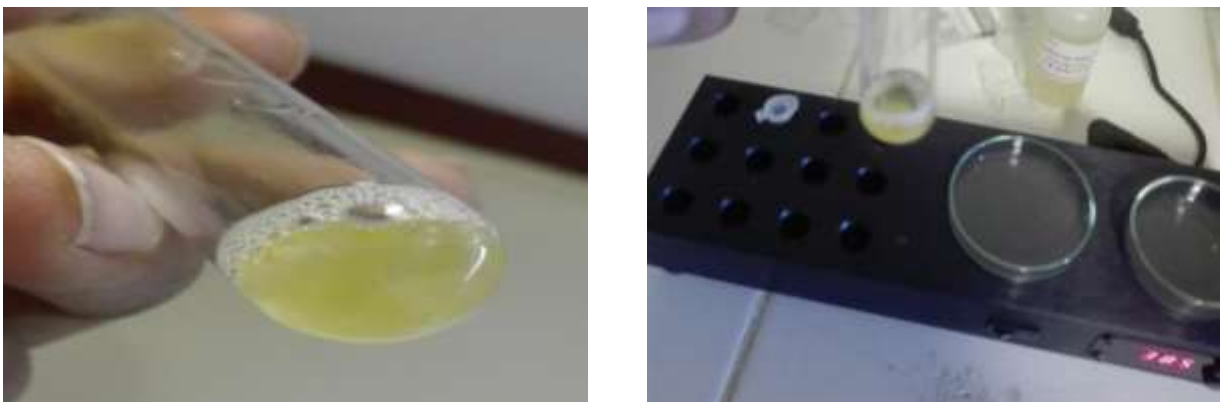


Foto 22. Eliminación de Líquido folicular y traspaso de ovocitos a cajas petri.



Foto 23. Filtrado de aceite mineral.

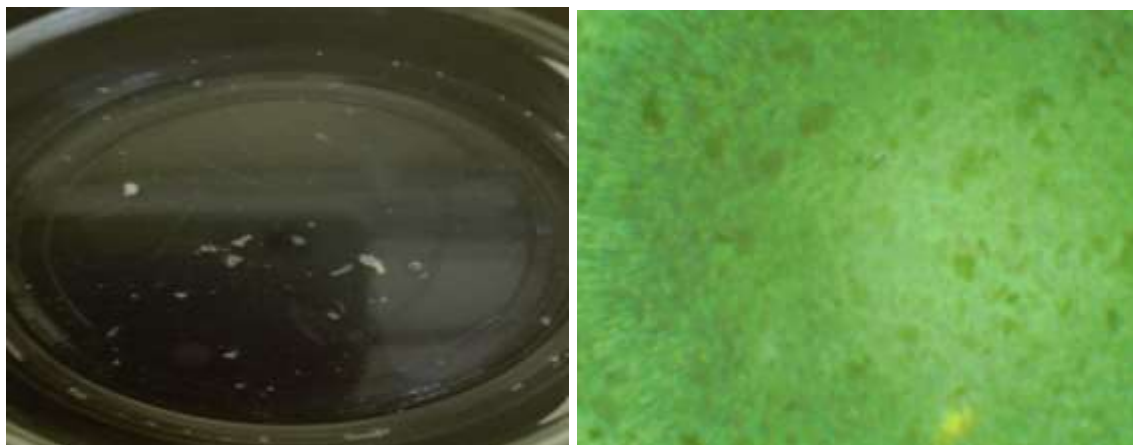


Foto 24. Separación de ovocitos de las impurezas que se encuentran en el folículo.



Observación de distintas categorías de ovocitos.

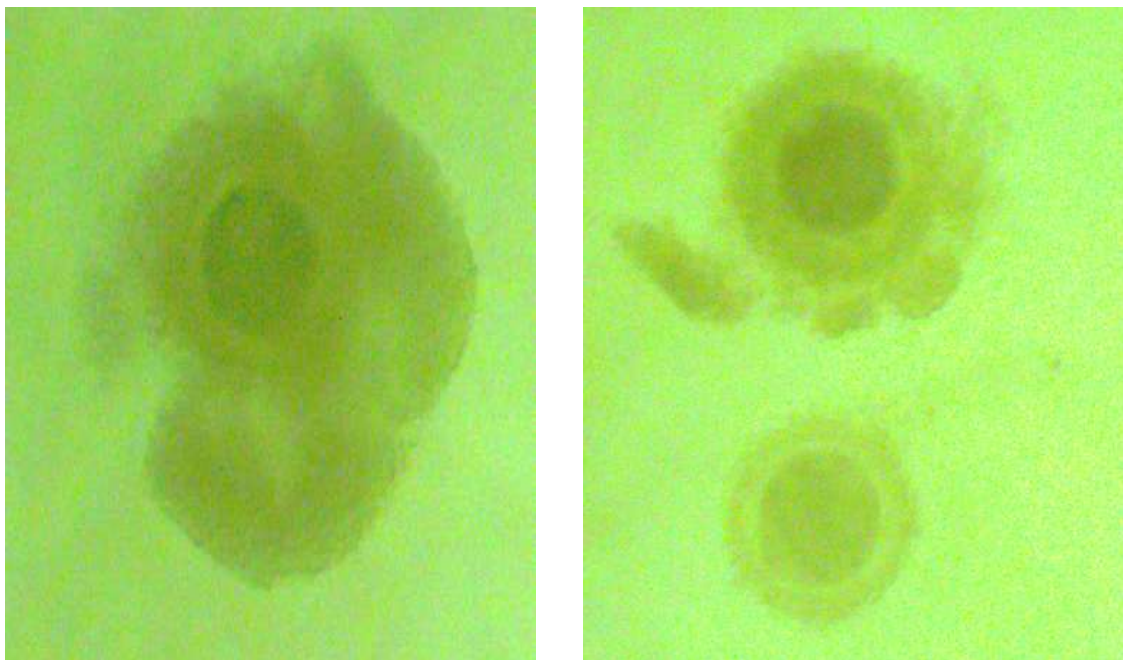


Foto 25. Ovocitos seleccionados para la maduración *in vitro* de distintas Categorías A, B, C Y D.



Gotas con medio de maduración de ovocitos antes de introducir a baño maría.



Foto 26. Selección de ovocitos puesto en las gotas de medio de maduración.



Acondicionamiento de la incubadora portátil antes de ingresar a baño maría.



Foto 27. Traslado de cajas Petri más ovocitos seleccionados al dispositivo portátil y acondicionamiento de CO₂ y extracción de aire.



Foto 28. Traspaso del dispositivo portátil con las cajas Petri al baño maría a temperatura de 38.5 °C durante 24 horas.

ANEXO 4

Evaluación de la Maduración de Ovocitos



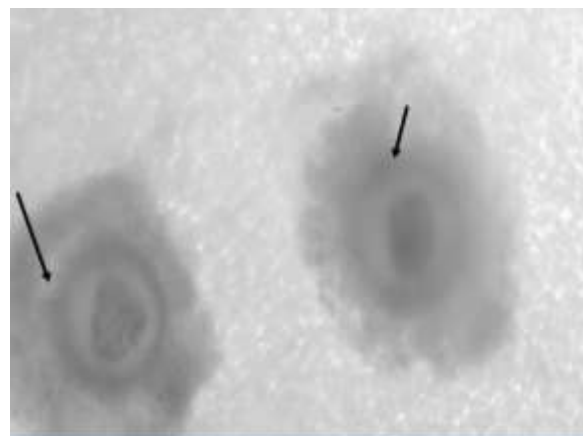
Acondicionado de temperatura después de extraer del baño maría.



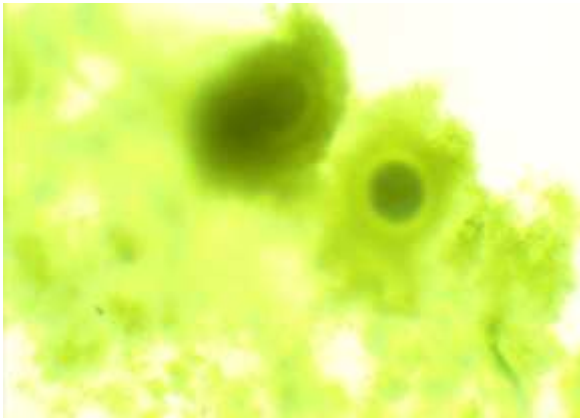
Foto 29. Extracción del dispositivo portátil del baño maría después de las 24 horas de la maduración de *in vitro*.



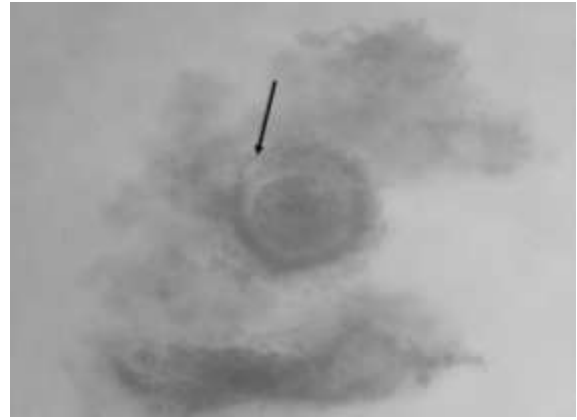
Antes de la Maduración *in vitro*



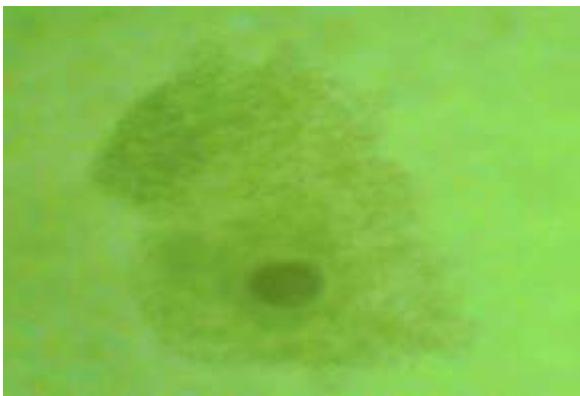
Después de la Maduración *in vitro*



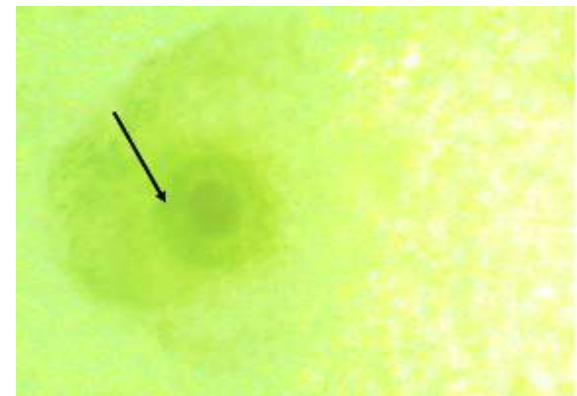
Antes de la Maduración *in vitro*



Después de la Maduración *in vitro*

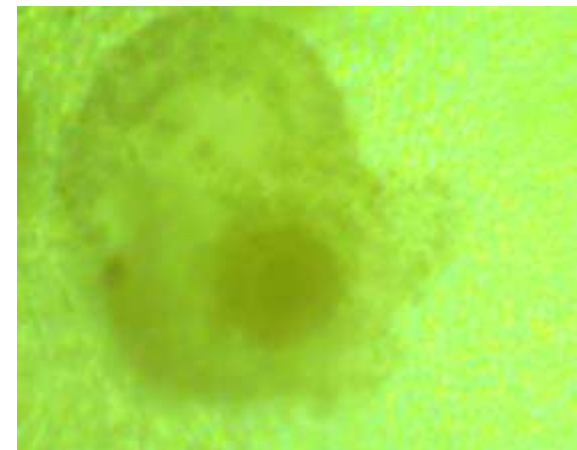
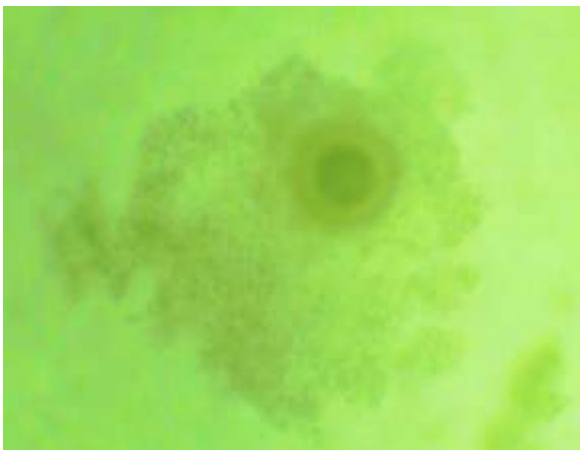


Antes de la Maduración *in vitro*



Después de la Maduración *in vitro*

Foto 30. Ovocitos seleccionados para la Maduración *in vitro* de categoría A pasando a maduración nuclear.



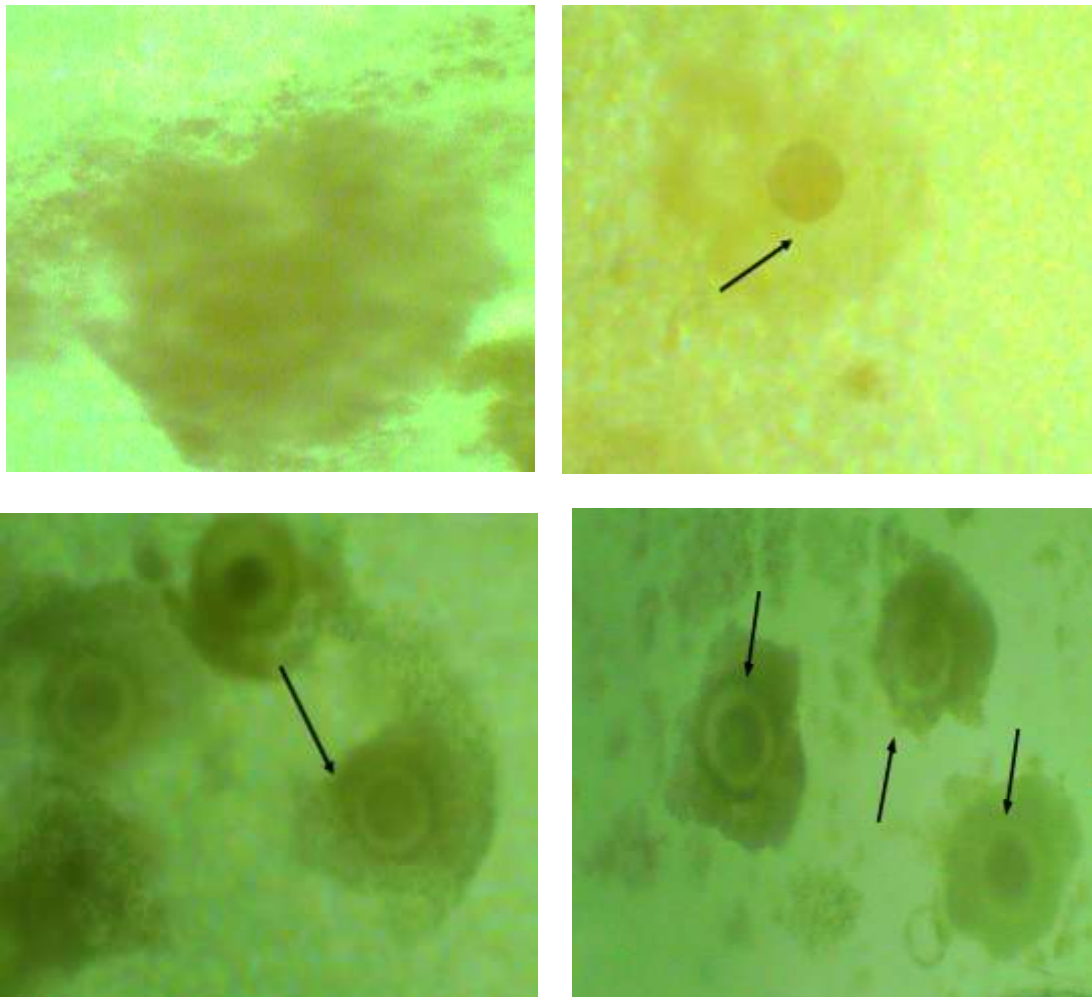
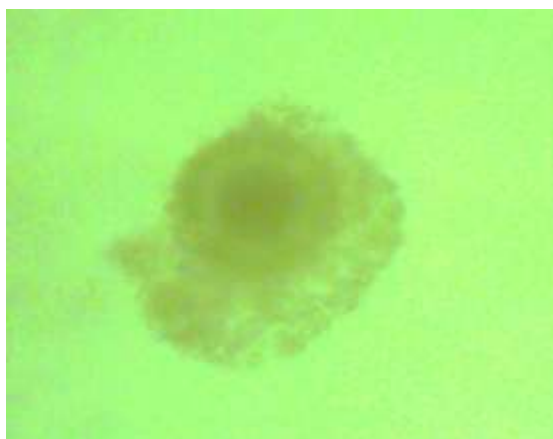


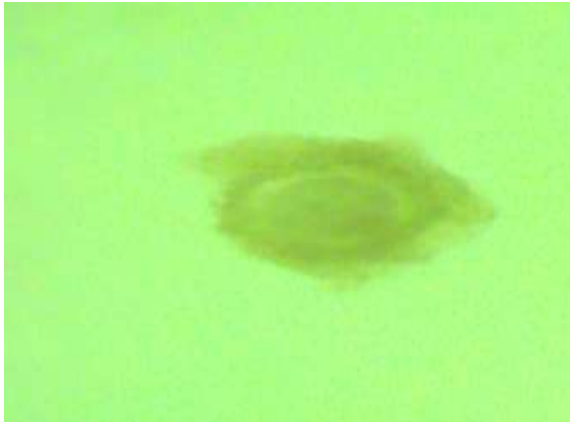
Foto 31. Ovocitos para la maduración *in vitro* de categoría observando maduración nuclear y expansión de cumulus.



Antes de la Maduración *in vitro*



Después de la Maduración *in vitro*



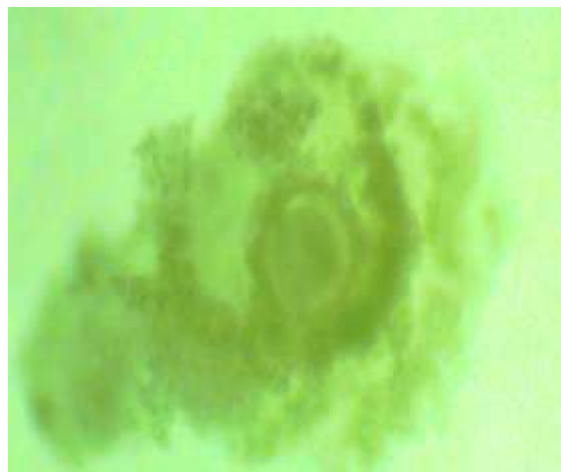
Antes de la Maduración *in vitro*



Después de la Maduración *in vitro*



Antes de la Maduración *in vitro*



Después de la Maduración *in vitro*

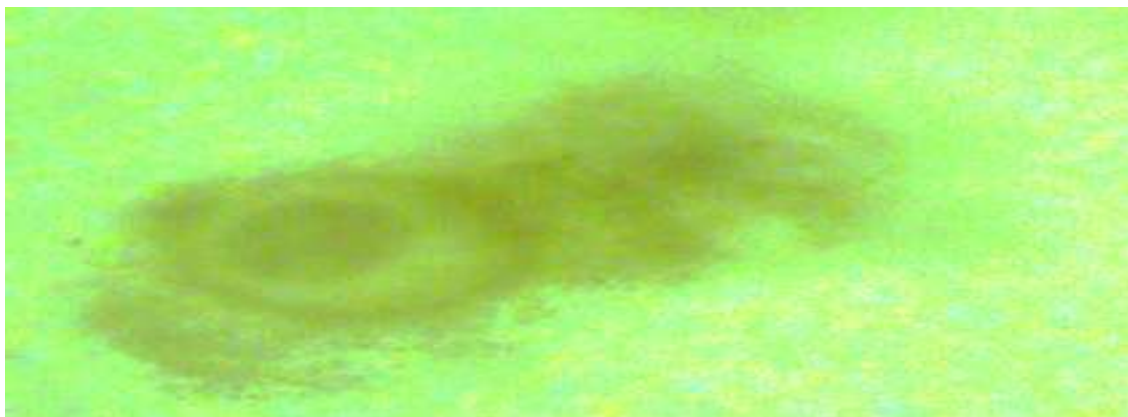
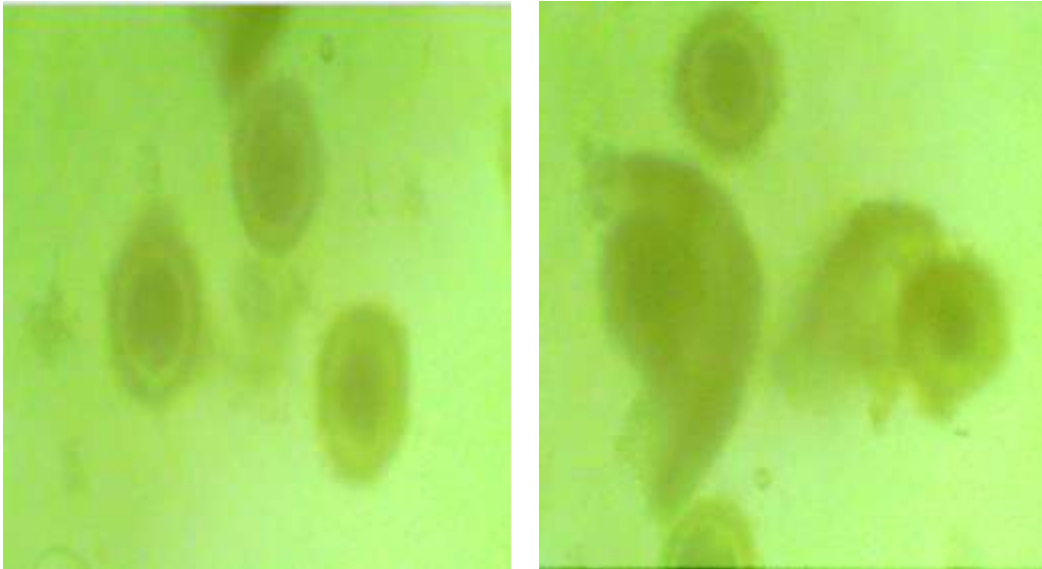


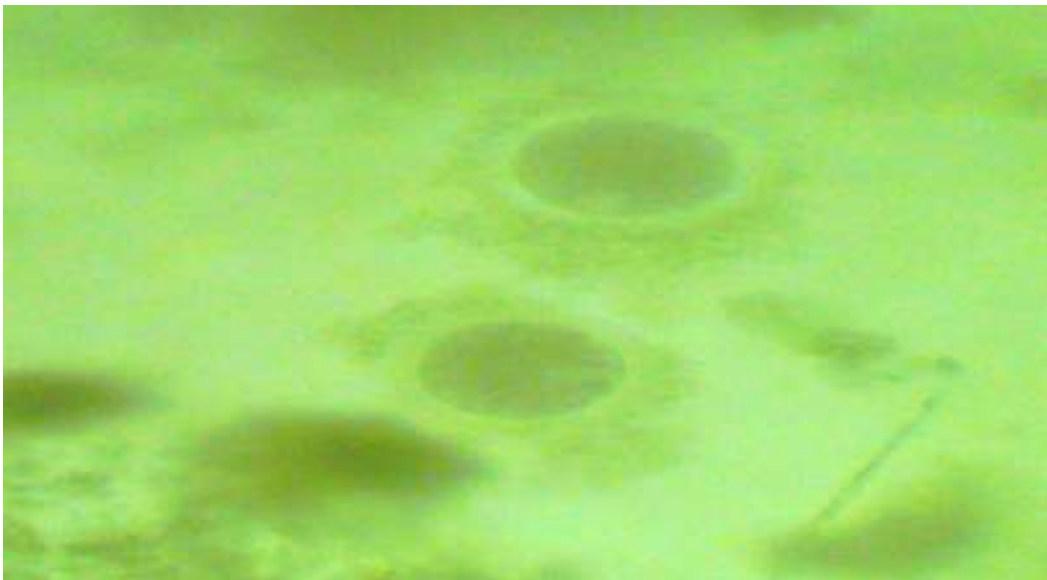
Foto 32. Ovocitos seleccionados para la Maduración *in vitro* de categoría B antes de la maduración, obtención de ovocitos maduros de categorías A y B. Observando el comienzo de expansión, formación y desfragmentación de cumulus.



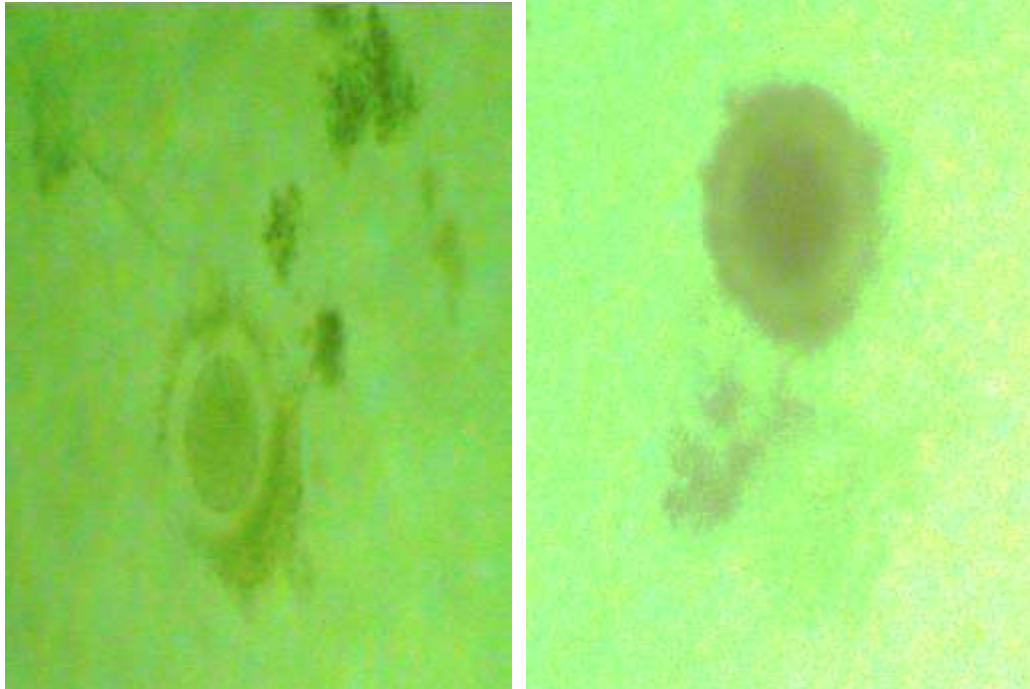
Antes de la Maduración *in vitro*

Después de la Maduración *in vitro*

Foto 33. Ovocitos seleccionados para la maduración *in vitro* de categoría C antes de la maduración, obtención de ovocitos maduros de categorías B llegando a tener expansión de cumulus.



Antes de la Maduración *in vitro*



Después de la Maduración *in vitro*

Foto 34. Ovocitos seleccionados para la Maduración *in vitro* de categoría D antes de la maduración, obtención de ovocitos maduros de categorías C, D Observando el comienzo de expansión y desfragmentación de cumulus.