



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS
DEL CÚMULO EN LA MADURACIÓN IN VITRO
DE TRES TIPOS MORFOLÓGICOS DE OOCITOS
PROCEDENTES DE OVARIOS DE VACAS DE MATADERO
DE LA CIUDAD DE LOJA
CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN”

Tesis de Grado previa a la obtención
del Título de Médico Veterinario
Zootecnista

AUTORA:

Verónica Lucía González Sarango

DIRECTOR:

Dr. Lenin Aguirre Riofrío. Mg. Sc.

Loja –Ecuador

2012

“EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL
CÚMULO EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE TRES TIPOS
MORFOLÓGICOS DE OOCITOS PROCEDENTES DE OVARIOS
DE VACAS DE MATADERO DE LA CIUDAD DE LOJA CON DOS
MEDIOS DE MADURACIÓN”

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADA AL TRIBUNAL COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA

Dr. José María Valarezo Mg. Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....

Dr. Galo Escudero Sánchez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

Med. Melania Uchuari Pauta
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

CERTIFICACIÓN

Dr. Lenin Aguirre Riofrío Mg. Sc.
DIRECTOR DE LA TESIS

CERTIFICA

Que una vez revisado el trabajo de investigación denominado “EVALUACIÓN DE LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO EN LA MADURACIÓN IN VITRO DE TRES TIPOS MORFOLÓGICOS DE OOCITOS PROCEDENTES DE OVARIOS DE VACAS DE MATADERO DE LA CIUDAD DE LOJA CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN”, realizado por la señorita egresada **Verónica Lucía González Sarango**, previo a la obtención del Título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, noviembre del 2012

Dr. Lenin Aguirre Riofrío Mg. Sc.
DIRECTOR

AUTORIA

Los conceptos, ideas, resultados, conclusiones y recomendaciones vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta y exclusiva responsabilidad de su autor

Verónica Lucía González Sarango

AGRADECIMIENTO

La realización de este trabajo de tesis no habría sido posible sin la participación de muchas personas a las que, desde aquí, quiero agradecer sinceramente su ayuda.

A los Doctores integrantes del comité asesor de la tesis, por la dirección y constante asesoría en la realización de este trabajo. Especialmente, por el apoyo y la confianza en mi depositada, en cada una de las actividades que integraron el programa académico para obtener el grado. De manera particular al Dr. Lenin Aguirre Riofrío Mg. Sc. por el apoyo brindado, durante la realización de todas y cada una de las tareas inherentes al proyecto de investigación.

A las Institución que hizo posible la culminación de una etapa más en mi formación académica-profesional: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja y al Camal de la Ciudad de Loja.

Al Dr. Manuel Quezada Padilla y Dra. Melania Uchuari gracias por su amistad, confianza y valioso apoyo durante el desarrollo práctico del trabajo de tesis, mil gracias por las inolvidables vivencias compartidas. A ellos, ¡gracias!

Aunque al final, pero no menos importante a mis Padres, Hermanos y mi querido Esposo. Simplemente ¡gracias! Uds. Son quienes han apoyado más que nadie el que yo haya llegado hasta aquí, gracias por su ayuda y su enorme paciencia y sobre todo por el ánimo que me han brindado durante todo este tiempo para lograr una meta más en mi vida. ¡Mil gracias!

Verónica G.

DEDICATORIA

Dedico esta investigación primeramente a mi Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme concedido la vida para lograr mis metas y objetivos, y sin olvidar su infinita bondad y amor.

A mi querida madre, Zoila por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, por su ejemplo de perseverancia y constancia, por sus valores, por la motivación constante, que me ha permitido ser una persona de bien, por ser la persona que me enseñó a ser quien soy, pero más que nada por su amor incondicional.

A mi amado padre, Jorge. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracteriza y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su apoyo en todo momento, por sus palabras de aliento y por su perdurable amor.

A mis hermanos Esthela y Jorge Luis por su constante amor inexplicable para mi superación y por sus grandes enseñanzas me han dado un ejemplo de vida, y me han sabido apoyar en todo momento

A mi amor eterno Xavier por siempre estar junto a mí ofreciéndome todo su cariño, su entrega, dedicación y sobre todo por brindarme su inmenso amor, comprensión y paciencia durante estos años de mi vida. Gracias por estar a mi lado incondicionalmente.

A mi precioso angelito José Andrés porque se ha convertido en mi razón de ser y la razón del despertar cada día

.

A mi patria Ecuador que es mi corazón, mi esencia y donde están mis mas grandes sueños y amores.

Vero

INDICE GENERAL

CONTENIDOS	Pág.
PRESENTACIÓN	i
APROBACIÓN	ii
CERTIFICACION	iii
AUTORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. MADURACION DEL OOCITO	3
2.1.1. El Ovocito	3
2.1.1.1. Oogenesis	3
2.1.1.2. Foliculogénesis	4
2.1.1.3. Crecimiento del ovocito	4
2.1.1.4. Maduración del ovocito	7
2.1.2. Obtención de los Ovocitos	9
2.1.2.1. Ovocitos post-ovulatorios	10
2.1.2.2. Ovocitos pre-ovulatorios	10
2.2. PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS	10
2.2.1. Factores que Influyen en la Calidad de los Ovocitos	10
2.2.1.1. Obtención de ovarios	10
2.2.1.2. Condiciones de transporte de los ovarios al laboratorio	11
2.2.1.3. Selección del folículo	11
2.2.1.4. Presencia de cuerpos lúteos y folículos quísticos en el ovario	11
2.2.1.5. Método de recuperación de los ovocitos	12
2.2.1.6. Criterio de selección de los complejos cúmulus-ovocito (COCs)	12
2.2.2. Sistema de Maduración In Vitro de los Ovocitos	13
2.2.2.1. Condiciones de cultivo	14

2.2.2.2. Medios de maduración	14
2.2.2.3. Modificaciones de los medios	15
2.2.2.4. Reguladores de la maduración in vitro	16
2.2.3. Descripción del Ovocito Maduro	19
2.2.3.1. Morfología del ovocito inmaduro	19
2.2.3.2. Morfología durante la maduración	20
2.2.3.3. Morfología del ovocito maduro	20
2.3. PROTOCOLOS DE MADURACION IN VITRO DE EMBRIONES	21
2.3.1. Recolección de Ovarios	21
2.3.2. Obtención de Ovocitos	21
2.3.3. Selección y Clasificación de los Ovocitos	22
2.3.4. Recolección del Suero de Vaca en Estro (SVE)	22
2.3.5. Maduración de los Ovocitos	22
2.4. TRABAJOS RELACIONADOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. MATERIALES	27
3.1.1. De Campo	27
3.1.2. De Laboratorio	27
3.1.2.1. Equipo e instrumental	27
3.1.2.2. Medios de cultivo y soluciones	27
3.1.3. De Oficina	28
3.2. MÉTODOS	28
3.2.1. Ubicación	28
3.2.2. Selección de Ovarios y Tamaño de la Muestra	28
3.2.3. Periodo de Entrenamiento	29
3.2.4. Recolección y Transporte de Ovarios	29
3.2.5. Obtención, Selección y Clasificación de Ovocitos	29
3.2.6. Recolección del Suero de Vaca en Estro (SVE)	30
3.2.7. Maduración In Vitro de los ovocitos	30
3.2.8. Procedimiento para la Evaluación de la Expansión de Ovocitos con los Medios de Maduración	31
3.2.8.1. Diseño experimental	31
3.2.8.2. Factores y niveles en estudio	31

3.2.8.3. Tratamientos	32
3.3. VARIABLES EN ESTUDIO	32
3.4. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	33
3.4.1. Análisis e Interpretación	33
3.4.2. Presentación de Resultados	33
3.5. REDACCIÓN DEL INFORME FINAL Y SOCIALIZACIÓN.	33
4. RESULTADOS	34
4.1. NÚMERO DE OVOCITOS OBTENIDOS POR OVARIO	34
4.2. CALIDAD Y VIABILIDAD DE OVOCITOS.	35
4.2.1. Calidad de Ovocitos	35
4.2.2. Viabilidad de Ovocitos	37
4.3. GRADO DE EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO SEGÚN TIPO DE OVOCITOS Y MEDIO DE MADURACIÓN	39
4.3.1. Expansión de las Células del Cumulo de los Ovocitos Aptos Para FIV	39
5. DISCUSIÓN	44
5.1. NÚMERO DE OVOCITOS OBTENIDOS POR OVARIO	44
5.2. CALIDAD Y VIABILIDAD DE OVOCITOS.	44
5.2.1. Calidad de Ovocitos	44
5.2.2. Viabilidad de Ovocitos	45
5.3. GRADO DE EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULO CON LOS DOS MEDIOS DE MADURACIÓN INVESTIGADOS.	46
6. CONCLUSIONES	48
7. RECOMENDACIONES	49
8. BIBLIOGRAFÍA	50
9. ANEXOS	53

CUADROS	Pág.
Cuadro 1. Resumen de factores y niveles en estudio	32
Cuadro 2. Tratamientos	32
Cuadro 3. Número de ovocitos recuperados en cada uno de los 60 ovarios estudiados	34
Cuadro 4. Promedio y porcentajes de los ovocitos según el tipo	37
Cuadro 5. Porcentaje del grado de expansión de las células del cumulo en los tres tipos de ovocitos con dos medios de maduración	39
Cuadro 6. Porcentaje de ovocitos expandido aptos para Fertilización In Vitro (FIV) de los tipo I, II, y III, con los dos medios de maduración	40
Cuadro 7. Análisis estadístico del porcentaje de ovocitos expandidos aptos para fertilización in vitro (FIV)	41
Cuadro 8. Porcentaje de ovocitos expandidos aptos para FIV de los tipos I, II y III	42

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
Figura 1. Punción folicular, presentación de la aguja sobre el lado lateral del folículo	12
Figura 2. Fotografía de ovocitos tipo I	35
Figura 3. Fotografía de ovocitos tipo II	36
Figura 4. Fotografía de ovocitos tipo III	36
Figura 5. Fotografía de ovocitos tipo IV	36
Figura 6. Porcentaje de ovocitos según el tipo	37
Figura 7. Porcentaje de ovocitos viables por ovario	38
Figura 8. Expansión del cumulus celular de ovocitos aptos para FIV	42
Figura 9. Promedio del porcentaje de ovocitos expandidos de los tipos I, II y III	43

El proyecto se orientó a evaluar la expansión de las células del cúmulo en la maduración in vitro de tres tipos morfológicos de oocitos con dos medios de maduración. Para ello se utilizó ovarios procedentes de vacas tipo leche, sacrificadas en matadero, de los cuales se obtuvieron los ovocitos para ser madurados in vitro.

Se utilizaron 1333 ovocitos de un total de 60 ovarios, produciendo un promedio de 22 ovocitos/ovario, el promedio de ovocitos madurables/ovario fue de 21 (95%), el promedio de ovocitos no madurables por ovario 1 (5%). Los ovocitos se clasificaron en tres categorías, en base al número de capas de células del cumulus y la apariencia de un citoplasma homogéneo; así se obtuvo un promedio por ovario de 6 (29%) ovocitos tipo I, 8 (38%) ovocitos tipo II y 7 (33%) ovocitos tipo III.

Para la maduración in vitro de los tres tipos morfológicos de oocitos se utilizaron dos tipos de medios de composición compleja, el TCM-199 y Ham's F-12, ambos se incubaron a una temperatura de 39° C, con una atmósfera gaseosa de 5% de CO₂, 5% de O₂ y con un 100% de humedad en el aire, durante 24-27 horas. El porcentaje de expansión total de los tres tipos de ovocitos fueron de 68,5 % y 72,9% con los medios TCM-199 y Ham's F-12 respectivamente ($P > 0.05$), la diferencia entre medios fue de 4,4% siendo superior el medio Ham's F-12, lo que no representa una diferencia significativa entre medios.

ABSTRACT

The project was aimed at evaluating the expansion of cumulus cells on in vitro maturation of three morphological types of oocytes using two types of maturation media. There were used ovaries from dairy cows, slaughtered at the abattoir, from which were obtained oocytes to be matured in vitro.

1333 oocytes were used from a total of 60 ovaries, producing an average of 22 oocytes per ovary. The average number of mature oocytes per ovary was 21 (95%), the average number of immature oocytes per ovary was 1(5%). The oocytes were classified into three categories, based on the number of layers of cumulus cells and the appearance of a homogeneous cytoplasm; this afforded an average of 6 per ovary (29%) type I oocytes, 8 (38%) type II oocytes and 7 (33%) type III oocytes.

For the in vitro maturation of three morphological types of oocytes, two kinds of media of complex composition were used; TCM-199 and Ham's F-12- Both of them were incubated at 39°C, with a gaseous atmosphere of 5% CO₂, 5% of O₂ and 100% of humidity in the air, for 24-27 hours. The percentage of total expansion of the three types of oocytes was 68.5% and 72.9% with the TCM-199 media and Ham's F-12 media respectively ($P>0.05$). The difference between the media was 4.4% being superior Ham's F-12 media, which represent no significant difference between media.

1. INTRODUCCIÓN

En diversos países de América Latina, se tiene el consenso de que el empleo de herramientas biotecnológicas en la producción animal ofrecerá nuevas oportunidades para el desarrollo de una producción más sustentable y altamente competitiva a nivel mundial. En este sentido, la biotecnología abre un nuevo mundo de oportunidades para la economía de los países de la región, ya que las exportaciones de recursos naturales y sus derivados son, en general, el principal motor para el crecimiento de la economía.

Desde mediados del Siglo XX, la biotecnología reproductiva ha permitido importantes logros en el mejoramiento genético de los programas de producción animal; convirtiéndose en uno de los productos emblemáticos de la investigación científica en el campo de las ciencias de la vida y la zootecnia.

La producción In Vitro (PIV) de embriones se encuentra dentro de la tercera generación biotecnológica de la reproducción animal (Thibier 1990), ésta es la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos diez años y constituye un gran apoyo en el desarrollo de técnicas que tienen un potencial importante en la reproducción animal.

Del mismo modo ha sido una alternativa en diversos problemas reproductivos en los que existe dificultad en el encuentro entre los espermatozoides y el óvulo, cabe destacar que ésta técnica es la única opción disponible para producir crías de hembras valiosas que por causas no genéticas son eliminadas de los sistemas productivos.

En nuestro país y particularmente en la provincia de Loja, la utilización de biotecnologías reproductivas es muy limitada, debido a muchos factores, como: la falta de formación y capacitación de técnicos, falta de infraestructura y equipos, poca inversión en el sector; y, sobre todo, falta de proyectos de investigación orientados a validar y acoplar estas tecnologías a nuestro medio. Como consecuencia, se observa bajos índices en los parámetros productivos y reproductivos que no ha

permitido alcanzar un desarrollo sostenido de producción bovina; repercutiendo indiscutiblemente en la economía de los ganaderos.

Esta investigación se realizó en el matadero de la ciudad de Loja desde el 3 de mayo del 2011 hasta el 8 de mayo del 2012, teniendo como objetivos específicos:

- Identificar del número de ovocitos obtenidos por cada ovario
- Identificar del número de ovocitos viables
- Comparación del grado de expansión de las células del cúmulo con dos medios en la maduración In Vitro de ovocitos bovinos: TCM-199 y Ham's F-12, en tres tipos morfológicos de ovocitos: I, II y III.
- Difundir resultados obtenidos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

9.1. MADURACIÓN DEL OVOCITO

9.1.1. El Ovocito

9.1.1.1. Ovogénesis

El número de gametos que poseen las hembras domésticas está fijado desde el mismo momento de su nacimiento. En la vida embrionaria comienza la oogénesis o formación del gameto femenino (gametogénesis) a partir de las células germinales primordiales (Eddy y col. 1981; Byskov 1982). Primero se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica.

La meiosis es un tipo de división celular exclusiva de las células germinales (ovogonias y espermatogonias) y su objetivo es doble: la reducción a un número haploide de cromosomas y la recombinación de la información genética (Polanski y Kubiak 1999). Antes de sufrir la meiosis, las células germinales replican su ADN y contienen en ese momento 4 copias de ADN y un número $2n$ de cromosomas, como cualquier célula diploide; mientras que entre las dos divisiones meióticas la replicación de ADN queda suprimido, lo que asegura que los gametos resultantes sean haploides.

La meiosis consiste en dos divisiones: en la primera, las dos células hijas pasan a tener $1n$ cromosomas y 2 copias de ADN; y en la segunda, las 2 células resultantes contienen $1n$ cromosomas y 1 copia de ADN. Así, con la meiosis se obtienen 4 células hijas haploides y genéticamente diferentes, en el caso del macho; mientras que en la hembra sólo da lugar a una célula, pues las dos divisiones meióticas son asimétricas, y en cada una se forman una célula grande y otra pequeña abortiva (corpúsculo polar).

La meiosis se detiene en dos momentos específicos: alrededor del nacimiento y en la ovulación y sólo se completará al producirse la fecundación. El proceso meiotico

consta de dos divisiones: meiosis I y II, divididas cada una en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase.

9.1.1.2. Folículo genésis

El ovocito primario se encuentra rodeado de una pequeña capa de células epiteliales constituyendo el folículo primordial para convertirse luego en folículos primarios, los cuales constan del ovocito rodeado de una capa de células cuboides que presentan gran actividad mitótica.

Debido a las gonadotropinas hipofisarias, las mitosis de las células epiteliales que rodean el ovocito y el crecimiento del mismo ocurren paralelamente. Las células epiteliales se multiplican y crecen disponiéndose en varias capas constituyendo el folículo 2° o pre-antral. Las secreciones de estas células producen mucopolisacáridos, por influencias hormonales, que se dispondrán alrededor del ovocito formando una membrana llamada zona pelúcida (ZP).

Mientras tanto el núcleo del ovocito sigue en reposo, aunque la actividad citoplásmica es intensa, cargándose de productos nutritivos, que son suministrados a través de las células que rodean el ovocito. Alrededor del folículo se disponen unas estructuras de tejido conjuntivo que se entrelazan a modo de barrera, constituyendo las tecas, que completarán su formación en el siguiente estadio folicular. Las células foliculares responden al estímulo de la FSH hipofisaria secretando sustancias como son metabolitos, hormonas esteroideas etc., que se van a acumular en el folículo formando una cavidad llamada antro folicular, lo que constituye el folículo antral (Zuckerniann 1962). Cuando las células foliculares sean capaces de responder al estímulo de la FSH, con síntesis hormonal, se denominan células de la granulosa.

9.1.1.3. Crecimiento del ovocito

Tras la formación del antro, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: por una parte, las células de la granulosa que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal; y por otra,

las células del cumulus oophorus que forman varias capas de células cilíndricas alrededor del ovocito (Canipari 1994). Cuando el folículo ha formado la cavidad antral, pasa a llamarse folículo terciario, antral o de Graaf, y alcanza un diámetro aproximado de 2,2 mm (Motlik y col. 1984).

El crecimiento del ovocito va unido a un aumento en el número de orgánulos citoplasmáticos, como mitocondrias, aparato de Golgi y ribosomas, y a la formación de los gránulos corticales a partir del complejo de Golgi (Stromstedt y Byskov 1999). Toda esta maquinaria celular, indicativa de una elevada actividad metabólica, permite la síntesis y almacenamiento de ARN, proteínas y enzimas; y en las últimas etapas del crecimiento, el desarrollo de la red de microtúbulos y filamentos. También durante la fase de crecimiento se forma la zona pelúcida (ZP), una cubierta extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos mamíferos. La capa de células del cumulus más próxima a la ZP se conoce con el nombre de corona radiata.

En esta etapa de crecimiento se van a establecer unas comunicaciones entre el ovocito y las células del cumulus, mediante unos procesos citoplasmáticos de las células de la corona radiata que cruzan la ZP y conectan con el oolema, conocidos como uniones tipo gap (Gilula y col. 1978). Las células de la granulosa también se interconectan mediante uniones tipo gap (Albertini y Anderson 1974). Este entramado de uniones intercelulares posibilita el intercambio de moléculas entre el ovocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea (Canipari 1994). Tienen la finalidad de facilitar la disponibilidad de nutrientes apropiados en el ratón como por ejemplo de piruvato y oxalato. Además de una función reguladora lo que constituye el proceso de “cooperación metabólica” (Canipari 1994).

Las células somáticas proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el ARNm en los ovocitos (Hunter 2000). Esta cooperación es bidireccional, de modo que los ovocitos secretan un factor de expansión del cumulus, además de unos factores solubles que regulan la esteroidogénesis de las células del cumulus, suprimen la luteinización y promueven la proliferación de células de la granulosa en cultivo (Brankin y col. 1999).

Si existiese una ruptura prematura de este contacto se produciría la muerte del ovocito, esto ocurre normalmente en aquellos ovocitos destinados a atresia. La ruptura normal de este complejo entre el oolema y las células circundantes del folículo puede ser necesaria para la migración y alineación de los gránulos corticales a lo largo de la membrana celular del ovocito.

Los folículos dominantes serán seleccionados de entre los folículos antrales para continuar su crecimiento (Stromstedt y Byskov 1999). La selección de los folículos que producirán ovocitos maduros listos para ovular en cada ciclo estral está determinada por la expresión de receptores para la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en sus células de la granulosa (Espey 1999).

Los receptores para la FSH, sólo presentes en las células de la granulosa, aumentan de número en la fase de crecimiento, desencadenando la expresión de una batería de genes que codifican factores de crecimiento, enzimas y proteínas involucradas en la esteroidogénesis y péptidos que regulan la liberación de gonadotropinas; los cuales se van a sintetizar y acumular en el fluido folicular. Además las células de la teca, estimuladas por la LH, van a sintetizar andrógenos que, posteriormente, serán transformados en estradiol por las células de la granulosa.

Los folículos dominantes tienen un mayor número de receptores para la FSH y son más sensibles a ella que el resto de folículos antrales, por lo que van a producir grandes cantidades de estradiol e inhibina. El estradiol y la inhibina van a regular negativamente la secreción de FSH y, al disminuir su concentración, los folículos menos sensibles a la FSH degeneran, sufriendo el proceso de atresia (Stromstedt y Byskov 1999).

Justo después del pico preovulatorio de LH, los folículos seleccionados comienzan una rápida expansión como resultado de la acumulación de fluido folicular en el antro. Las altas concentraciones de gonadotropinas en el fluido folicular cambian el patrón de síntesis de esteroides de las células de la granulosa y la teca, y preparan al ovocito para la reanudación de la meiosis y la maduración (Espey 1999).

9.1.1.4. Maduración del ovocito

La maduración del ovocito, dividida en maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente. El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio en los niveles de gonadotropinas, en especial de LH, además de la reanudación de la meiosis, se desencadena otras transformaciones dentro del folículo, como alteraciones en la esteroidogénesis folicular y cambios en el complejo cumulus-ovocito (COCs) (Moor y col. 1990; Motlik y col. 1986).

La respuesta inmediata de las células de la granulosa a la interacción con la LH es la activación de la adenilato ciclasa y la generación de adenosín mono fosfato cíclico (AMPc). Por tanto, la reanudación de la meiosis viene precedida por un aumento en el AMPc; lo que parece estar en contradicción con su actuación en el manteniendo del reposo meiotico en el ovocito. La explicación es que el AMPc desempeña un papel doble en la regulación de la meiosis.

Los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas en los folículos antrales pequeños son transferidos de manera continua al ovocito, a través de las uniones tipo gap, para mantenerlo en el reposo meiotico, pues el ovocito no es capaz de producir AMPc a los niveles necesarios. Sin embargo, a partir de la formación de receptores para la LH en las células del cumulus y granulosa del grupo de folículos dominantes, éstos pueden responder al pico preovulatorio de la LH produciendo grandes cantidades de AMPc.

Las elevadas concentraciones de AMPc en los folículos dominantes median en la acción de la LH sobre la conexina 43, una proteína que forma parte de las uniones tipo gap ováricas. Mediante reacciones de fosforilación/ defosforilación, se producen cambios en la conformación de la misma produciendo una reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos y, por tanto, en la cooperación metabólica entre sus células (Gilula y col. 1978). Este proceso se lo conoce con el nombre de expansión o mucificación del cumulus y se produce 16 horas después del pico de gonadotropinas. Además en este proceso se produce el ácido hialuronico

el cual es fundamental para la expansión de las células del cúmulo (Brackett B.). Bajo esas condiciones, el flujo de AMPc desde las células del cumulus hacia el ovocito desciende y el ovocito reanuda la meiosis, lo que puede explicar por qué se produce una reanudación espontánea de la meiosis al extraer los ovocitos de los folículos y cultivarlos in vitro (Dekel 1999).

La maduración nuclear comienza tras la reanudación de la meiosis. El paso de vesícula germinal (VG) a metafase II (MII) conlleva: la disolución de la membrana nuclear conocida como “rotura de la vesícula germinal”, formación del huso meiotico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I; para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) y al paso del ovocito al estadio de MII. La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica con la formación del primer CP, alcanzando el estadio de MII, unas 36-40 horas después del pico de LH, tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis.

Biggers y col. (1977) comenta que la vesícula germinal se despolariza debido a un incremento de la permeabilidad a los iones de calcio (Brackett B.); Kikuchi y col. (1995) explica que el factor promotor de maduración o metafase (MPF) en forma activa es necesario para la rotura de la VG., la condensación de la cromatina, alcanzando un pico en metafase I y II, para descender en anafase I y II, indicando que su inactivación es necesaria para esta progresión. Por otra parte, la reorganización de los microtúbulos y la apropiada orientación del huso durante la MI parece estar mediada por las protequinasas MAP (Mitogen-activated Protein Kinases), cuya actividad también está inhibida de algún modo por el AMPc y aumenta con la reanudación de la meiosis. A diferencia del MPF, la actividad de las MAPK permanece elevada en los estadios de anafase.

La maduración citoplasmática, no se desarrolla directamente con la progresión de la meiosis pero preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posterior (Abeydeera 2002). Investigaciones por Noyes (1952) en ratas y Chang (1955) en conejos revela que la fecundación y el desarrollo normal del ovocito sólo podrán ocurrir si estos han alcanzado por lo menos la primera división meiotica en

vivo aunque este potencial aumenta si estos han alcanzado la metafase II en vivo (Brackett B.).

En el citoplasma del ovocito se produce una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales (GC). Tras la rotura de la VG, las mitocondrias migran para situarse en una posición perinuclear durante la maduración siendo este movimiento mitocondrial necesario para la progresión de la maduración. Los GC son un tipo especial de lisosomas primarios, formados a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Los GC migran hacia la periferia del ovocito, aumentan de número al final del periodo de maduración y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa lo que es fundamental para el bloqueo de la poliespermia.

La maduración citoplasmática implica una reprogramación de la síntesis proteica. Parte del ARNm que había sido almacenado durante la fase de crecimiento comienza a transcribirse, sintetizándose nuevas proteínas que serán esenciales en la progresión de la meiosis, la regulación de la penetración espermática y la descondensación de la cabeza del espermatozoide (Moor y col. 1990). Entre estas proteínas, el factor de crecimiento del pronúcleo masculino, será esencial para la formación del pronúcleo masculino tras la penetración del espermatozoide.

La maduración citoplasmática es aparentemente dependiente entre 6 a 8 h del período inductivo dentro del folículo seguido por un período de marcada actividad biosintética dentro del ovocito (Moor y Warnes 1978). La inducción de esta maduración requiere de esteroides, síntesis de proteína intrafolicular y posiblemente el AMPc como mediador de la acción de gonadotropinas, FSH y LH (Brackett B.).

9.1.2. Obtención de los Ovocitos

La obtención de ovocitos puede realizarse en diferentes fases de su maduración y mediante diversos sistemas, pudiendo agruparse en:

9.1.2.1. Ovocitos post-ovulatorios

Son ovocitos que han madurado in vivo en el propio tracto genital de la hembra. Se localizan en el oviducto poco después de la ovulación. Se los puede obtener por laparotomía o sacrificio de los animales. El intervalo entre la ovulación y la recogida del ovocito es muy importante, ya que los ovocitos permanecen fecundables por un periodo de 10-12 horas.

9.1.2.2. Ovocitos pre-ovulatorios

Son ovocitos inmaduros los cuales se los obtienen mediante la punción ovárica de los folículos y existen de dos tipos:

- a. **Ovocitos obtenidos próximos al momento de la ovulación:** Son los que casi han completado su maduración en el propio folículo ovárico, la técnica más utilizada es la aspiración folicular de animales sometidos a tratamientos de superovulación y por sacrificio de los animales.
- b. **Ovocitos inmaduros:** se pueden obtener por aspiración folicular o de los ovarios de hembras sacrificadas en matadero, se obtienen de los folículos antrales de un determinado diámetro, a estos se los coloca en medios de cultivo para su maduración in vitro.

9.2. PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS

9.2.1. Factores que Influyen en la Calidad de los Ovocitos

9.2.1.1. Obtención de ovarios

La obtención de los ovocitos se puede realizar de vacas procedentes de dos fuentes:

- A partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios (Herradón y col. 2007). Todos los autores están de acuerdo en que se debe realizarse inmediatamente después de la muerte del animal. El transporte se lo realiza en soluciones salinas-tampón o fosfato-salinas (PBS) con antibióticos (Hyttel y col. 1987).

- A partir de animales vivos utilizando la aspiración transvaginal ecoguiada (OPU). Se puede recoger ovocitos en las hembras de más de 6 meses de edad, durante los primeros 3 meses de gestación y a partir de las 2-3 semanas del postparto, por lo que no interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de las hembras donantes. En el caso de hembras muy jóvenes (menos de 6 meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia (Herradón y col. 2007).

9.2.1.2. Condiciones de transporte de los ovarios al laboratorio

La duración y temperatura del transporte de los ovarios desde su recolección hasta el laboratorio puede influir en la calidad de los ovocitos, mientras se incrementa el tiempo de transporte disminuirá la maduración de los ovocitos. El transporte se puede llevar a cabo en una solución PBS a temperatura ambiente o en una solución salina al 0,9% (Palma y col. 1993).

9.2.1.3. Selección del folículo

Según Motlik y Fulka (1986), los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de ovocitos incompetentes o bien atrésicos, por el contrario los folículos mayores de 10 mm presentan un mayor número de ovocitos degenerados, la mayoría de autores seleccionan folículos de diámetros entre 2 y 8 mm (Liehnian y col. 1986; Xii y col. 1987; Pavlov y col. 1992). Ya que pueden responder al estímulo de maduración, experimentando los cambios morfológicos y funcionales necesarios para alcanzar una total capacidad de desarrollo. (Yoon y col. 2000) Wurtb y Kruij (1992) señalan que los ovocitos, 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.

9.2.1.4. Presencia de cuerpos lúteos y folículos quísticos en el ovario

Ocampo y col. (1993) mencionan que la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios afecta la calidad de los ovocitos recuperados, por lo que recomiendan no utilizar ovarios con cuerpos lúteos y desechar aquellos ovarios que presentan folículos quísticos.

9.2.1.5. Método de recuperación de los ovocitos

Para hembras sacrificadas en el matadero el método más simple y comúnmente empleado es el de aspiración de los complejos ovocito cumulus (COCs) ya sea con el empleo de cánulas unidas a bombas aspirantes o por jeringas. Los tamaños más usados de cánulas varían entre 18 a 21G con 2,5 cm de largo en jeringas de 10 ml. (Palma y col. 1993; Iritani y Niwa 1977; Xu y Greve 1988) y la punción del folículo se hace en forma lateral.

Al aspirar con jeringa, el líquido folicular y los ovocitos recolectados se coloca directamente en una placa de Petri o en un tubo, para luego decantarlo, el sobrenadante se elimina y se toma el decantado con 2 a 5 ml de líquido folicular con ayuda de una pipeta de Pasteur. Se coloca en una placa de Petri, la cual debe taparse todo el tiempo en que no se busque ovocitos a fin de evitar contaminaciones. Se toma en cuenta que la exposición excesiva de los ovocitos, en el líquido folicular, a temperatura ambiente puede provocar la formación de redes de fibrina entre los COCs, inutilizando el producto de la recolección (Palma y col. 1993).



Fig. 1. Punción folicular, presentación de la aguja sobre el lado lateral del folículo

También se utiliza el método de Slicing o corte en el cual se fijan los ovarios con una pinza hemostática, luego se realizan cortes longitudinales y transversales con un bisturí del número 22 en la superficie de un ovario colocado sobre una placa petri. (Palma y col. 1993; Moor y Trounson 1977; Lu y col. 1988). La recuperación de ovocitos por disección de los folículos es más trabajosa que por aspiración, asegura la recuperación de ovocitos exclusivamente de folículos no atrésicos (Ding y col. 1992).

9.2.1.6. Criterio de selección de los complejos cúmulus-ovocito (COCs)

Los ovocitos inmaduros recolectados para FIV se clasificarán con la intención de identificar uno o varios marcadores de calidad morfológica del complejo cumulus

ovocito, con valor predictivo sobre las tasas de desarrollo de blastocistos. La evaluación morfológica se llevará a cabo con una lupa estereoscópica de 40 y 60 X, tomando en cuenta el aspecto del cúmulo y del citoplasma del ovocito. La selección se efectúa siguiendo dos criterios:

- a. **Aspecto citoplasmático del ovocito:** este debe poseer un citoplasma granuloso fino y uniforme, sin mostrar espacio perivitelino ni vacuolizaciones.
- b. **Aspecto y morfología del cúmulo celular que le rodea:** no debe encontrarse expandido ni disperso sino compacto y sin aglutinaciones. Varios autores señalan que se produce una mayor tasa de maduración in vitro cuando se seleccionan ovocitos que presentan las células de la corona radiada claramente diferenciadas del resto del cúmulo celular que rodea al ovocito. (Leibfried y First 1979; Xu y col. 1987; Loos y col. 1992)

La clasificación morfológica de los ovocitos se lo realiza según el número de capas de células del cúmulo:

- a. Tipo I: rodeado de 6 capas compactas de células del cúmulo, con COCs claro y transparente y citoplasma homogéneo
- b. Tipo II: rodeados de 4 a 6 capas celulares, poseen un Ooplasma con granulación más gruesa que en el tipo I.
- c. Tipo III: Se encuentran parcialmente desnudos en sus células del cúmulo.
- d. Tipo IV: se encuentran desnudos.
- e. Tipo V: se encuentran atrésicos.
- f. Tipo VI: se encuentran degenerados

9.2.2. Sistema de Maduración In Vitro de los Ovocitos

Las condiciones físicas específicas del ambiente en el que se maduran los ovocitos (osmolaridad, pH y composición iónica del medio; temperatura y tensión de CO₂ y O₂ de la incubadora; volumen de cultivo; y tiempo de incubación), así como la mayor o menor definición del medio de maduración utilizado (suero, células somáticas, etc.) van a influir en la maduración de los ovocitos.

9.2.2.1. Condiciones de cultivo

- a. Temperatura:** los márgenes de temperatura se encuentran entre 37 y 41°C, aunque la temperatura óptima es de 39°C, coincidiendo con la temperatura corporal de la especie (Leibfried-Rutledge y col. 1987).
- b. pH:** muchos sistemas enzimáticos del ovocito bovino sólo actúan a un pH muy limitado, inhibiendo su actividad por debajo de 6,7 y por encima de 7,6. El pH se regula, en el medio de maduración, gracias a la concentración de CO₂ y de bicarbonato sódico. El pH óptimo se encuentra entre 7,2 y 7,4. 25mM de bicarbonato sódico asegura el mantenimiento del pH, además de proveer un mejor sustrato energético.
- c. Atmósfera gaseosa:** Esta juega un papel decisivo en el control de varias funciones metabólicas y del pH intra y extracelular. Todos los autores señalan que se emplea las siguiente mezcla gaseosas: 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% N₂, con una humedad cercana al 100%.
- d. Duración:** La duración del cultivo de maduración, hasta alcanzar el estadio de metafase II, en ovocitos bovinos, varía según distintos autores, la mayoría establece un periodo de cultivo de 24 a 27 horas.

9.2.2.2. Medios de maduración

Su objetivo es asegurar el mantenimiento de los requisitos metabólicos y energéticos que el ovocito necesita para su maduración fuera del folículo ovárico. Se destacan el TCM- 199, HAM F-10 y F-12 TALP, MEM, Medio de Waymouth, etc., estas son formulaciones complejas de aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas, nucleótidos etc. El medio de cultivo condiciona el éxito de los sistemas de fecundación y el posterior desarrollo in vitro de los embriones (Rose y Bavister 1992).

9.2.2.3. Modificaciones de los medios

Los medios de maduración se suelen suplementar con sustancias que favorecen la capacidad del ovocito para madurar in vitro como sueros, sustratos energéticos, hormonas, factores de crecimiento etc.

- a. **Suero:** El ovocito necesita un aporte exógeno de nitrógeno de origen proteico, que no puede formar por sí mismo, se puede utilizar suero sanguíneo-Suero Fetal Bovino (SFB) y Suero de Vaca en Estro (SVE), o alguno de sus derivados como la Albúmina Sérica Bovina (BSA). Eppig y col. (1983), señalan además que la suplementación del medio con suero estimula la producción de un factor citoplasmático que favorece la maduración y la fecundación de los ovocitos madurados. Los sueros, se inactivan antes de su utilización, a (56°C durante media hora) con el fin de desnaturalizar las proteínas del complemento, ya que éstas pueden causar reacciones inmunes que impiden el desarrollo y crecimiento normal del ovocito.

Sambuisso y Therfall (1989), señalan que la composición de suero de vaca en estro cambia por las fluctuaciones endocrinas que se producen en este periodo del ciclo estral, modificándose las concentraciones de sustancias que son transferidas al ovocito, como una mayor concentración de LH.

- **Suero Fetal Bovino (FCS, fetal cow serum)**

Se obtiene de fetos de 3 a 7 meses de gestación (Lindl y Bauer 1994). La sangre es centrifugada después de la coagulación, el suero obtenido debe tener bajo contenido de hemoglobina y endotoxinas. Posteriormente es filtrado en columnas de 0,1 µm de diámetro. En términos virológicos generales es posible encontrar en el suero 17 virus distintos. Durante la recolección y la centrifugación del suero fetal pueden ocurrir contaminaciones con bacterias y micoplasmas.

La filtración y los controles de esterilidad del suero filtrado constituyen un punto importante en el momento de elegir el producto. La contaminación del suero no procesado con bacterias Gram – es, generalmente la consecuencia de negligencia durante la recolección y procesado, y conduce a la producción

de endotoxinas. Por ello es importante el adquirir suero certificado de origen, libre de virus, micoplasmas y endotoxinas.

- **Suero de vaca en estro**

Luego de la extracción de la sangre en tubos de cristales, éstos deben agitarse vigorosamente para desencadenar la coagulación. No se aconseja reposar la sangre a 37°C, si la extracción no asegura la recolección libre de bacterias (Gram-). Centrifugar a 2000r durante 30 min. Se extrae el suero y se vuelve a centrifugar en un nuevo tubo estéril. Los tubos con hemólisis deben ser descartados. El producto final es un suero amarillo y cristalino. Luego de la última centrifugación, se procede a fraccionar, filtrar (0,22µm Ø) y se conserva rápidamente a -80°C o -20°C. La eficaz recolección y manipulación no requiere de filtración antes del envasado.

b.Otras sustancias: El ovocito, in vivo, utiliza el piruvato y el oxalato sódico como compuestos energéticos. Estos compuestos son transferidos, junto con otras sustancias, a través de las uniones intercelulares que le relacionan con las células del cúmulo. Al iniciarse la maduración in vitro, fuera del entorno folicular, se deben suministrar en el medio de cultivo sustancias que permitan al cúmulo la formación de estos complejos energéticos. Por tanto se suministra piruvato sódico, lactato sódico, glutamina, glucosa y bicarbonato sódico, este último no solo mantiene un pH adecuado también favorece la síntesis de piruvato sódico en las células del cúmulo.

9.2.2.4. Reguladores de la maduración in vitro

a. Hormonas: En el folículo ovárico en crecimiento, se producen cambios regidos por la secreción y actuación de las gonadotropinas, esteroides, factores de crecimiento y otras moléculas.

- **Gonadotropinas:** La complementación hormonal de los medios de MIV mejora la maduración nuclear y la expansión del cúmulo (Meinecke y col. 1979). Además, las gonadotropinas ejercen una acción positiva sobre la formación de pronúcleo

masculino (PNM). La adición de gonadotropinas aumenta las tasas de maduración en diversas especies animales: hamster, coneja, oveja, cerda y vaca.

La hormona luteinizante (LH) ha demostrado tener efectos positivos en los sistemas de maduración in vitro. Shalgui y col (1979) indican que la LH mejora la maduración citoplásmica del ovocito. La gonadotropina coriónica humana (hCG) se ha utilizado en los medios de maduración en lugar de la LH.

La hormona folículo estimulante (FSH) ha demostrado inducir la maduración en ovocitos de rata, coneja y vaca. Muchos autores indican que la FSH no es imprescindible para la maduración nuclear del ovocito pero tiene influencia en la expansión del cúmulo celular (Sato y col. 1978; Leibfried y First 1979; Fukui y col. 1982). El mecanismo mediante el cual las gonadotropinas actúan sobre la maduración no está aún claro.

- **Esteroides:** Las acciones que ejercen estas hormonas en el proceso de maduración in vitro no son aún bien conocidas del todo, sin embargo, cuando se añaden esteroides a un medio de maduración de ovocitos in vitro, algunos autores no describen cambios importantes en la maduración de ovocitos de vaca, rata y cerda.

Los más utilizados son el estradiol y la progesterona, estos completan la maduración nuclear y citoplasmática. El estradiol por sí solo parece no afectar a la maduración nuclear del ovocito, pero sí influye en la maduración citoplasmática y sobre todo en la fecundación; se lo considera un factor importante para la formación del pronúcleo masculino (Fukui y col. 1982).

El 17- β -estradiol se incluye normalmente en los medios de maduración in vitro a razón de 1 $\mu\text{g/ml}$, aunque se desconoce su importancia y su mecanismo de acción. No obstante, otros estudios recientes indican que los estrógenos afectan negativamente a la maduración nuclear de los ovocitos bovinos, provocando una disminución de la proporción de ovocitos que alcanzan la metafase II y de blastocistos obtenidos, al tiempo que incrementan la frecuencia de anomalías nucleares. Sin embargo, la presencia de suero y FSH en el medio neutraliza el

efecto negativo de los estrógenos lo que podría explicar la dificultad para observar estos efectos adversos (Herradón y col. 2007).

La progesterona sobre los oocitos bovinos no describe ningún efecto positivo (Fukushima y Fukui 1985). La variedad de los efectos descritos por la adición exógena de hormonas en los medios de maduración de oocitos in vitro es tan grande que, incluso, hay autores que señalan que el tipo de acción hormonal depende del medio de cultivo empleado (Fukui y col. 1985).

- **Otras:** Además de las hormonas citadas anteriormente, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y sus agonistas han demostrado estimular la maduración de oocitos en rata (Hillensjo y Maire 1980). Por otro lado, estudios recientes indican que la hormona estimulante del tiroides (TSH) puede influir en la posible regulación de la maduración, ya que el añadirlos a medios de maduración in vitro aumenta la expansión del cúmulo y la tasa de maduración en oocitos bovinos (Younis y Brackett 1992).

b. Sistema AMPc: el sistema que regula los niveles de adenosín mono fosfato cíclico (AMPc), en el interior del oocito, es el encargado de mantener su núcleo en reposo meiotico (GV), esto se ha comprobado en animales de laboratorio. En este mecanismo de regulación dos enzimas actúan aumentando y luego disminuyendo las concentraciones de AMPc. 1.) la adenilato-ciclasa origina una elevación de los niveles de APMc intracelular, 2.) fosfodiesterasa (PDE) actúa disminuyéndola.

Por lo tanto, cuando se añaden, al medio de maduración, agentes que estimulan la actividad de la adenilato-ciclasa o sustancias que inhiben la acción de la PDE, aumentan los niveles intracelulares de AMPc en el oocito. Entre los primeros, el foskolín y entre los segundos, la isobutilxantina (Sirard y col. 1990). De la misma manera, todos los análogos estructurales del AMPc, como el dibutilil AMPc (dbcAMP) o el 8-bromo AMPc también inhiben la activación de la meiosis (GVBD) (Sirard y col. 1992). El mecanismo intrínseco del proceso de desactivación y activación meiótica es la regulación ejercida por una protein—quinasa (PKC), la

cual fosforiliza una proteína desconocida, que es la encargada de mantener la pausa meiótica (GV).

Cuando bajan los niveles intracelulares de AMPc en el ovocito también disminuyen los de PKC, y la proteína se desfosforiliza, lo cual da como resultado la activación meiótica del ovocito (GVBD) (Bonslaeger y col. 1986). Los altos niveles de AMPc, inducidos por las gonadotropinas, rompen las uniones intercelulares en el cúmulo con el ovocito y, en consecuencia, el flujo de AMPc se interrumpe activándose la meiosis.

Además del AMPc, moléculas como la hipoxantina y la adenosina, presentes en el líquido folicular de ovocitos inmaduros, ejercen también un efecto inhibitor sobre la activación de la meiosis del ovocito (Downs y col. 1985), también sustancias como el OMI, GCF o sustancia similar a la sustancia inhibidora de la maduración (MIS).

9.2.3. Descripción del Ovocito Maduro

9.2.3.1. Morfología del ovocito inmaduro

El ovocito, aislado de su folículo presenta un núcleo grande, situado periféricamente, rodeado de la membrana nuclear y con un nucleolo apenas visible, en los ovocitos bovinos. Este estado nuclear se corresponde con el estadio de dictiatio meiotico. Los orgánulos citoplasmáticos se distribuyen por todo el citoplasma de la célula, 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. 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. El ovocito inmaduro presenta el cúmulo celular compacto e incluso dificulta la visión del propio ovocito (Leibfried y First 1979).

9.2.3.2. Morfología durante la maduración

El inicio de la maduración está marcado por cambios nucleares y citoplasmáticos, en ovocitos bovinos ocurre entre las 3 y 6 horas del comienzo de la maduración, empiezan con cambios en el núcleo del ovocito y culminan con la desaparición de la membrana nuclear (GVBD). De 12 a 16 horas, se llega al estadio de metafase; y de 19 a las 24 horas se produce la extrusión del primer corpúsculo polar al EPV, llegando al estadio de metafase II, donde se detiene nuclearmente la meiosis, en espera de que ocurra la fecundación.

Dentro de los cambios citoplasmáticos se habla de una elevada actividad de síntesis proteica y una reordenación de los sistemas de microtúbulos, debido a la intensa actividad cromosómica, existe también un agrupamiento de las mitocondrias y los gránulos corticales que comienzan a situarse periféricamente. Las uniones intercelulares, comienzan a retraerse a las 3 horas de iniciada la maduración y a las 18 horas sólo quedan restos.

Entre las 10 y 12 horas, del comienzo de la maduración, el cúmulo que rodea el ovocito comienza su expansión, que llega a ser máxima a las 18 horas del inicio del cultivo. La expansión se debe a la mucificación entre las células, por la presencia de ácido hialurónico en la matriz intercelular y, también, a la posible presencia de un factor desconocido que favorece la expansión y que se transfiere desde el mismo ovocito hasta el cúmulo (Buccione y col. 1990).

9.2.3.3. Morfología del ovocito maduro

Se caracteriza por la expansión total del cúmulo celular y por la presencia del primer corpúsculo polar en el EPV. A nivel nuclear, los cromosomas presentan la configuración de metafase II. Los cambios citoplasmáticos no se completan hasta las 30 horas de haber comenzado la maduración, aunque nuclearmente la maduración finaliza a las 24 horas.

Dentro de los cambios citoplasmáticos incluyen la colocación de los gránulos corticales a la periferia, situándose bajo la membrana plasmática; y del agrupamiento

de mitocondrias y RER en cisternas de gran tamaño. En esta fase final sigue existiendo una alta actividad de síntesis proteica con el fin de preparar al ovocito nuclear y citoplasmáticamente, para la fecundación (Moor y Gandolfi 1987; de Loos y col. 1992).

9.3. PROTOCOLOS DE MADURACION IN VITRO DE EMBRIONES

9.3.1. Recolección de Ovarios

Los ovarios se recolectan después de la faena. El transporte de los ovarios se realiza en solución fisiológica (0,9% NaCl) a temperatura ambiente. En el laboratorio, se lavan los ovarios y se los libera de tejidos acompañantes (si los hubiere).

9.3.2. Obtención de Ovocitos

- a. En el laboratorio se los lava con un masaje severo hasta que la solución salina a 38.5° C se torne clara, con dos o tres cambios de esta y se los coloca en un contenedor plástico de 1 litro, con solución salina a 38.5° C
- b. Se sujeta los ovarios por la base con una pinza de hemostasia
- c. Para la aspiración se puncionan todos los folículos terciarios visibles que posean un tamaño comprendido entre 2-6 mm de diámetro.
- d. Luego se incide los folículos en sentido vertical y horizontal por todo la ancho y largo del ovario
- e. Se recibe el fluido folicular y sangre en el medio de colección de ovocitos (OCM), medio TCM-199 (sin rojo de fenol, y sin glutamina), no se colecta los folículos de 10 ml o más (no incidirlos) ni seccionar los cuerpos lúteos.
- f. Se sumerge los ovarios dentro del OCM, se agita vigorosamente y se exprime.
- g. El líquido folicular con los ovocitos se deja sedimentar por 15 minutos antes de aislar los complejos cumulus-ovocito.
- h. El contenido se coloca a baño maría (38° C) por mínimo 5 minutos para que precipiten los CCOs,
- i. Con una pipeta Pasteur se aspira el sedimento de CCOs del fondo del tubo y depositar dentro del filtro celular

- j. Con una jeringuilla de 10 ml con OCM se riega la base del filtro y las paredes con este invertido sobre la placa que contendrá 2ml de OCM precalentado
- k. Se recolecta los Complejos Cúmulos Ovocitos (CCOs) tan rápido como sea posible.
- l. Continuar lavando y transfiriendo los CCOs en cada compartimento de la placa X, dejando atrás los desechos, procurar en cada paso llevarlos lo más limpios posible, repetir la operación, después de lavar por dos o tres veces los CCOs deben quedar sin despojos.

9.3.3. Selección y Clasificación de los Ovocitos

La clasificación morfológica de los ovocitos se lo realiza según el número de capas de células del cúmulo transfiriéndolos a una placa X nueva según las características de los mismos:

- a. Tipo I: rodeado de 6 capas compactas de células del cúmulo, con COCs claro y transparente y citoplasma homogéneo
- b. Tipo II: rodeados de 4 a 6 capas celulares, poseen un Ooplasma con granulación más gruesa que en el tipo I.
- c. Tipo III: Se encuentran parcialmente desnudos en sus células del cúmulo.
- d. Tipo IV: se encuentran desnudos.
- e. Tipo V: se encuentran atrésicos.
- f. Tipo VI: se encuentran degenerados

9.3.4. Recolección del Suero de Vaca en Estro (SVE)

Luego de la extracción de la sangre en tubos de cristales, éstos deben agitarse vigorosamente para desencadenar la coagulación. Se centrifugará a 2000r durante 30 min. Se extraerá el suero y se vuelve a centrifugar en un nuevo tubo estéril. Los tubos con hemólisis se descartarán. Finalmente se procederá a conservar a -20°C .

9.3.5. Maduración de los Ovocitos

- a. Con anterioridad se preparará el medio de cultivo celular y se le añadirá en el suero de vaca en estro.

- b. Los ovocitos se colocarán en placas de cultivo de 4 cavidades con 100-400 μ l de medio de maduración. Se colocarán entre 30-40 ovocitos/cavidad.
- c. Se colocará la placa conteniendo los ovocitos en el medio de maduración en la estufa incubadora a 38,5° C y 5% CO₂ en el aire durante 18-24h.

9.4. TRABAJOS RELACIONADOS

9.4.1. González N.; Echegaray A.; Gil L.; y Falceto M.V. del Departamento de Patología Animal (Reproducción y Obstetricia) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza 2000, realizó el siguiente proyecto Efecto del 17 β -estradiol en la maduración y fecundación in vitro de ovocitos bovinos obtenidos de novillas sacrificadas en el matadero.

En este trabajo se ha valorado la influencia del 17 β -estradiol en la maduración de ovocitos bovinos, previa al proceso de fecundación in vitro. Para ello se han utilizado ovarios procedentes de novillas sacrificadas en matadero, de los cuales se han obtenido los ovocitos para ser madurados y fecundados in vitro.

Para comprobar el efecto del 17 β -estradiol sobre los ovocitos se utilizaron dos tipos de medios: uno de composición compleja, el TCM 199 y otro de composición simple, el TALP. Ambos se suplementaron con altas dosis de 17 β -estradiol durante los lavados previos a la maduración in vitro. Los resultados reflejan que estas dosis elevadas durante los lavados tienen un efecto positivo sobre la maduración ovocitaria: un 46,93% y un 45,83% de ovocitos maduros (en TCM 199 y TALP respectivamente) frente a un 37,5% y un 33,3% en los tratamientos control, sin 17 β -estradiol ni en los lavados ni durante la maduración. En la fecundación in vitro y en la capacitación espermática se utilizó el medio TALP.

Los resultados muestran que un medio simple, como el TALP, es válido para soportar tanto la maduración como la fecundación in vitro, obteniéndose con este medio un 69,23% de ovocitos normalmente fecundados, dentro de los ovocitos que maduraron. En segundo lugar, se sitúa un medio complejo, el

TCM 199, utilizando 17β -estradiol en los lavados previos a la maduración, con un 44,4% de ovocitos normalmente fecundados.

9.4.2. Erika Patricia Azorín Vega de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad de Iztapalapa 2003, realizó el trabajo sobre “Estandarización de la técnica de cultivo in vitro de embriones de Hámster”, cuyos objetivos fueron de estandarizar las condiciones que se requieren para lograr el cultivo in vitro de embriones de hámster de ocho blastómeros.

Se obtuvo los siguientes resultados: se prepararon diferentes medios, excepto el M2 que se utilizó comercial, y se midieron algunas de sus propiedades físicas:

Medio	PH	Osm
M2	7.5	275
TALP	8 – 8.8	286 - 289
HECM-6	7.6 - 8	280 - 282
HECM-9	7.5 – 7.7	278 - 282

TABLA 1. Propiedades físicas iniciales de los medios

La colección de los embriones del grupo experimental 1 se hizo de las 65-67 horas postcoito. Se obtuvieron un total 88 embriones (7.3 embriones/hembra) de los cuales 65 fueron cultivados (74%). Los embriones de 8 células fueron predominantes (78, 86%), y en menor cantidad embriones de 7 blastómeros (5,7%) y Mórulas (5, 7%).

Después de 24 horas de cultivo los embriones permanecieron sin cambios. A 48 horas, algunos presentaban vesículas pero sin desarrollo y con un pH constante.

Medio	PH _(inicial)	PH _(2 hrs incubación)
TALP _{base}	8 – 8.8	8.5 – 8.8
TALP+BSA	7.7 – 7.8	7.6 – 7.7
TALP+BSA+glut+ác. pirúvico	7.6 – 7.7	7.5 – 7.6

Se realizó modificación del pH inicial y después de 2 hrs. de incubación en el medio TALP. Se obtuvieron 57 embriones (8.1 embriones/hembra) de los cuales se cultivaron 24 (42%). Los embriones de 8 blastómeros predominaron (81%) y en menor cantidad mórulas (11,19%). A las 6 horas de incubación los embriones se mostraron ligeramente fragmentados y en las horas siguientes

aumentó este daño, aún y cuando el pH del medio a las 2 horas fue de 7.6 y se mantuvo en 7.5 hasta las 48 horas.

En el grupo 3 se obtuvieron 130 embriones (5.9 embriones/hembra), de estos se cultivaron 59 (45%). Predominaron los embriones de 8 blastómeros (48%), seguido por las mórulas (57,44%) y algunos de 2 a 7 blastómeros (10.8%). La morfología de los embriones en cultivo se alteró; a las 6 horas presentaban fragmentación y a las 12 horas estaban completamente degenerados. El pH del medio se redujo (7- 7.2). A las 24 horas de incubación se hizo cambio de medio pero el aspecto de los embriones no mejoró.

En las hembras del grupo 4 tratadas con HECM-9, se obtuvieron 141 embriones (7 embriones/hembra) de los cuales 57 se incubaron con la adición de aminoácidos diluidos individualmente (40%) y 21 (15%) con mezcla de aminoácidos. Predominaron los embriones de 8 blastómeros (80, 57%) y en menor cantidad mórulas (51, 36%) y embriones de 2 a 7 blastómeros (10, 7%).

9.4.3. Concepción Ahuja Aguirre, Felipe Montiel Palacios, Ponciano Pérez Hernández y Jaime de Postgraduados, Campus Veracruz, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz, México, 2009, realizaron el siguiente trabajo “Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos”.

Se evaluó la tasa de desarrollo de blastocistos bovinos producidos in vitro utilizando medio de cultivo convencional para embriones bovinos y medio de cultivo para producción in vitro (PIV) de embriones humanos. Se obtuvieron ovocitos por aspiración de ovarios de vacas Cebú sacrificadas en matadero, se maduraron y fertilizaron. Se cultivaron por 48 h en medio KSOM o en medio HTF modificado. Entre los 7 a 9 días post-FIV, se evaluó el desarrollo embrionario a etapa de blastocisto. La tasa de maduración in vitro fue 89,7%. La tasa de división fue 82,3% para ovocitos cultivados en KSOM y de 80,1% para ovocitos cultivados en HTF ($P>0,05$). La tasa de desarrollo de blastocistos fue 31,6% para embriones cultivados en KSOM y 29,5% para

embriones cultivados en HTF/IVC-Two/IVC-Three ($P>0,05$). En conclusión, las tasas de desarrollo in vitro de blastocistos bovinos fueron similares para los embriones cultivados en un medio convencional para PIV de embriones bovinos y para los embriones cultivados en medios utilizados para PIV de embriones humanos, por lo que ambos tipos de medios pueden utilizarse para la PIV de embriones bovinos con resultados aceptables.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. MATERIALES

10.1.1. De Campo

- Termo para el transporte de los ovarios con solución salina
- Guantes descartables
- Ovario de vacas de matadero
- Tijeras y bisturí

10.1.2. De Laboratorio

10.1.2.1. Equipo e instrumental

- Lupa estereoscópica
- Cámara de flujo laminar
- Baño termostático
- Incubadora de CO₂ y O₂, con camisa de agua
- Balanza analítica
- Pipetas automáticas
- Platina térmica
- Jeringas descartables de 2ml, 5 ml y 10 ml. y agujas descartables de 18 G
- Tubos para centrifuga
- Placas de Petri
- Vasos de precipitación
- Filtros 0,22 µm de diámetro
- Guantes descartables
- Guillets

10.1.2.2. Medios de cultivo y soluciones

- Solución salina al 0,9 %
- Tampón fosfato salino modificado (PBSM)
- Medio de maduración TCM- 199

- Medio de maduración Ham's F 12
- Suero de vaca en estro (SVE)
- Metanol absoluto
- Ácido acético glacial
- Orceina acética
- Aceite mineral

10.1.3. De Oficina

- Computadora e impresora
- Lápices y esferográficos
- Calculadora
- Hojas de papel
- Memoria flash
- Libreta
- Cámara fotográfica

10.2. MÉTODOS

10.2.1. Ubicación

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fertilización In Vitro del Centro de Biotecnología Reproductiva Animal (CEBIREA), perteneciente a la Universidad Nacional de Loja, localizado en la Ciudadela Universitaria "La Argelia", a 2100 msnm, a una Latitud: 04° 01' 50" Sur y una Longitud: 79° 11' 58" Oeste, con una precipitación anual de 769.7 mm. Se encuentra dentro de la formación ecológica Bosque Seco Montano Bajo, el viento tiene dirección sur-norte con una velocidad de 3.5 m/s y con una temperatura promedio que fluctúa entre 13.6 a 16.2°C. (González 2009)

10.2.2. Selección de Ovario y Tamaño de la Muestra

Se recolectaron ovarios de bovinos tipo leche en el matadero de la Ciudad de Loja, de estos se escogieron ovarios funcionales que poseían folículos en diversas fases

de crecimiento, para cada tratamiento se utilizaron diez (10) ovarios y cada ovario constituyó una repetición, por lo tanto existieron diez repeticiones para los seis tratamientos estudiados, estos fueron seleccionados considerando su tamaño, desarrollo folicular y la no presencia de cuerpos lúteos.

10.2.3. Periodo de Entrenamiento

Se realizó un periodo de entrenamiento de dos semanas en el Laboratorio de Fertilización In Vitro del CEBIREA, en la cual se realizaron las siguientes actividades: recolección de ovarios, extracción y clasificación de ovocitos, maduración in vitro, fijación y tinción de ovocitos expandidos; y evaluación de la expansión en el microscopio.

10.2.4. Recolección y Transporte de Ovarios

Los ovarios se recolectaron luego de la faena, se escogieron ovarios funcionales que poseían folículos en diversas fases de crecimiento, en el matadero de la Ciudad de Loja, de vacas y vaquillonas no preñadas tipo leche y fueron colocados en termos con solución salina estéril (0.9% de NaCl) a una temperatura de 37°C, una vez en el laboratorio se escogieron a los mejores ovarios, se eliminó todo el tejido conectivo que sujeta al ovario, se pesaron, cada uno de ellos y se seleccionaron los que no poseían cuerpos lúteos y cuyos pesos se encontraban entre 4 -10 g posteriormente se realizaron los siguientes pasos:

10.2.5. Obtención, Selección y Clasificación de Ovocitos

- Se incidieron los folículos con el guillet en sentido vertical, luego horizontal, por todo lo ancho y largo del ovario.
- Con ayuda de una jeringa de 60ml se lavó a presión el ovario
- Lo recolectado se colocó en una caja petri para su observación y recolección de los ovocitos.
- Su clasificación morfológica fue de la siguiente manera:

- Tipo I: rodeado de 6 o más capas compactas de células del cúmulo, con COCs claro y transparente y citoplasma homogéneo
- Tipo II: rodeados de 4 a 6 capas celulares, poseen un citoplasma con granulación más gruesa que en el tipo I.
- Tipo III: Se encuentran parcialmente desnudos en sus células del cúmulo.

Para identificar el número de ovocitos viables se utilizó la lupa estereoscópica donde se los seleccionó y clasificó; y se los relacionó con el número de ovocitos obtenidos por cada ovario.

10.2.6. Recolección del Suero de Vaca en Estro (SVE)

Se extrajo la sangre en tubos de cristales de 10 ml, se lo centrifugó a 2000 r.p.m durante 30 min. Se extrajo el suero y se lo volvió a centrifugar en un nuevo tubo estéril y se procedió a conservar a -20°C .

10.2.7. Maduración In Vitro de los Ovocitos

- a. El SVE se incorporó el día del cultivo .
- b. Se preparó dos horas antes las placas de cultivo, realizando gotas de 50 μl del medios de maduración correspondiente, 5 μl de suero de vaca en estro, y se lo cubrió con una gota de aceite mineral
- c. Se albergó alrededor de 10 ovocitos/gota dependiendo del tipo correspondiente
- d. Se colocó en la incubadora a una temperatura de 39°C , con una atmosfera gaseosa de 5% de CO_2 , 5% de O_2 y con una humedad relativa del 100% durante 24 horas.
- e. Se extrajo los ovocitos madurados y se los colocó en una caja petri y se procedió a lavarlos continuamente con la solución PBS.
- f. Se colocó los ovocitos expandidos en placas portaobjetos y se los sumergió en una solución fijadora (metanol absoluto-ácido acético glacial, 3:1) durante 24h.
- a. Se secó las placas con papel absorbente y se colocó una gota de tintura (orceina acética 45 ml, agua desionizada 45ml y agua bidestilada 55ml), se

cubrió con una placa cubreobjetos para observar los resultados en el microscopio con lente de 40X.

La evaluación del grado de expansión del cumulo celular se la realizo en base a los criterios de expansión:

- Expansión nula. No existe expansión apreciable del cúmulo.
- + Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del ovocito.
- ++ Expansión apreciable, de unos dos diámetros del ovocito.
- +++ Expansión máxima, de más de tres diámetros del ovocito, e incluso de las células de la corona radiada

10.2.8. Procedimiento para la Evaluación de la Expansión de Ovocitos con los Medios de Maduración

10.2.8.1. Diseño experimental

Para evaluar el efecto de los medios de maduración sobre la expansión de los ovocitos se utilizó un arreglo factorial 2 x 3 (medios de maduración x tipos de ovocitos) dispuesto en un diseño completamente Randomizado, dando un total de seis tratamientos con diez repeticiones, en donde cada ovario se lo consideró como una unidad experimental.

10.2.8.2. Factores y niveles en estudio

Se evaluaron dos factores: medios de maduración con dos niveles: medio TCM-199 y medio Ham's F-12; y tipo de ovocito con tres niveles, tipos de ovocitos. Los factores y niveles se presentan en el siguiente cuadro.

Los tipos se describen en el numeral 3.2.5 y los medios de maduración TCM-199 y Ham's F-12 se presentan en el anexo 1y 2, respectivamente.

Cuadro1. Resumen de factores y niveles en estudio

FACTORES	NIVEL (Tipo de ovocito)
Medios de Maduración	TCM-199
	Ham's F-12
Tipos de ovocitos	Tipo I
	Tipo II
	Tipo III

10.2.8.3. Tratamientos

De la combinación de los dos medios y los tres tipos se obtienen seis tratamientos.

Cuadro 2. Tratamientos

TRATAMIENTOS
A : medio TCM + ovocitos tipo I
B: medio TCM + ovocitos tipo II
C: medio TCM + ovocitos tipo III
D: medio Ham's + ovocitos tipo I
E: medio Ham's + ovocitos tipo II
F: medio Ham's + ovocitos tipo III

10.3. VARIABLES EN ESTUDIO

Durante el presente trabajo de investigación se estudiaron las siguientes variables:

- Número de ovocitos obtenidos.
- Calidad y viabilidad de ovocitos.
- Grado de expansión de las células del cumulo en los tres tipos de ovocitos con dos medios de maduración.

10.4. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

10.4.1. Análisis e Interpretación

Para las variables 1 y 2 relacionados con el número, calidad y viabilidad de los ovocitos se obtuvo promedios, porcentajes, desviación estándar y coeficiente de variabilidad.

Para evaluar el efecto de los medios sobre la expansión de las células del cúmulo sobre los tres tipos de ovocitos se realizó un análisis de varianza mediante la prueba de F y la prueba de Duncan para la comparación entre promedios.

Cada una de las variables fue analizada y los resultados obtenidos se los compararon con datos de otras investigaciones.

10.4.2. Presentación de Resultados

Los resultados obtenidos se presentaron en cuadros estadísticos, en forma textual y con su correspondiente representación gráfica.

10.5. REDACCIÓN DEL INFORME FINAL Y SOCIALIZACIÓN.

En el informe final se presentó por escrito siguiendo el esquema de presentación de tesis de la UNL. Una vez obtenidos los resultados se difundió a través de una charla a los dos últimos módulos de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia y se elaboró un tríptico (Anexo 3), con la finalidad de compartir las experiencias obtenidas durante el trabajo de investigación.

11. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se analizaron de acuerdo a las variables planteadas en la investigación. En primer lugar, se indica el porcentaje de recuperación de ovocitos respecto al número de ovarios utilizados. En segundo lugar, se expone el porcentaje de ovocitos viables respecto al número de ovocitos recuperados. Finalmente, las cifras del grado de expansión de las células del cúmulo alcanzadas luego de la maduración in vitro de ovocitos de acuerdo a cada tratamiento aplicado.

11.1. NÚMERO DE OVOCITOS POR OVARIO

Se seleccionaron y diseccionaron 60 ovarios funcionales (Anexo 4), sin la presencia de cuerpos lúteos y cuyos pesos se encontraban entre 4 -10 g, se aplicó la técnica de obtención de ovocitos, y se realizó el conteo de estos utilizando una lupa estereoscópica, en el cuadro 3, se presenta los resultados de esta variable.

Cuadro 3. Número de ovocitos recuperados en cada uno de los 60 ovarios estudiados.

Ovar.	Ovocit. recup.	Ovar.	Ovocit. recup.	Ovar.	Ovocit. recup.	Ovar.	Ovocit. recup.	Ovar.	Ovocit. recup.	Ovar.	Ovocit. recup.
1	29	11	14	21	29	31	27	41	24	51	27
2	24	12	43	22	16	32	29	42	29	52	31
3	29	13	39	23	26	33	39	43	18	53	39
4	18	14	16	24	29	34	16	44	17	54	16
5	17	15	9	25	17	35	9	45	19	55	9
6	36	16	4	26	36	36	4	46	17	56	4
7	19	17	38	27	19	37	38	47	25	57	38
8	17	18	20	28	17	38	20	48	10	58	20
9	25	19	27	29	25	39	27	49	10	59	27
10	10	20	20	30	10	40	20	50	26	60	20
Total de ovocitos								1333			
Promedio								22			
Rango								13 – 32			
s								9,68			
CV								44%			

Se recuperaron 1333 ovocitos en los 60 ovarios diseccionados, produciendo una media de 22 ovocitos/ovario y un rango de 13 a 32, una desviación estándar (s) de 9,68; mientras que el coeficiente de variación (CV) de 44%.

11.2. CALIDAD Y VIABILIDAD DE OVOCITOS.

11.2.1. Calidad de Ovocitos

Luego de obtener los ovocitos se procedió a seleccionarlos y clasificarlos de acuerdo al número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma. Los resultados obtenidos por tipo de ovocitos en cada uno de los 60 ovarios se presentan en el Anexo5, los mismos que se resumen de la siguiente manera.

- Ovocitos tipo I: fueron aquellos que se encontraban rodeados de 6 o más capas compactas de células del cúmulo, con COCs claro y transparente y citoplasma homogéneo (Figura 2). De los 1333 ovocitos recuperados 386 correspondieron a esta categoría, con un promedio de 6/ ovario.

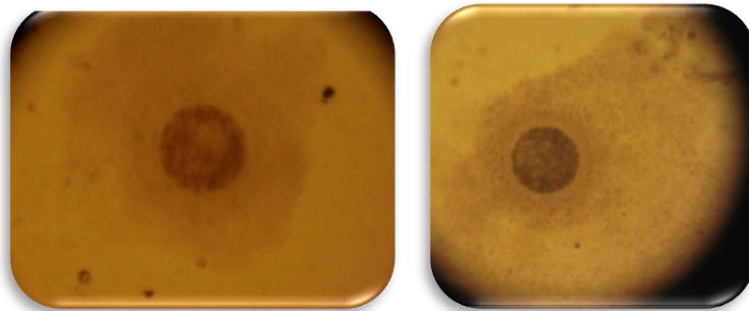


Figura 2. Fotografías de ovocitos tipo I. Nótese seis capas de las células del cúmulo y en su centro el citoplasma con granulaciones homogéneas.

- Ovocitos tipo II: fueron aquellos rodeados de 4 a 6 capas celulares, con un citoplasma con granulación más gruesa que en el tipo I (figura 3). Se encontraron un número de 457, equivalente a 8/ovario.

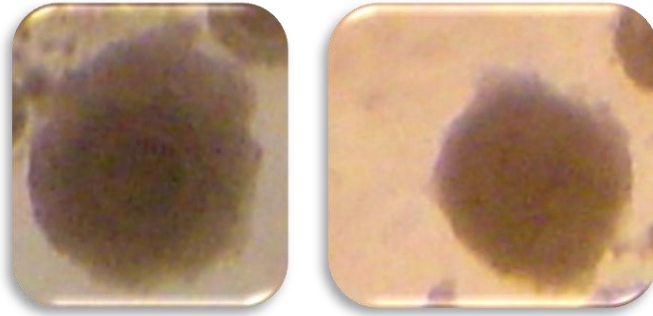


Figura 3. Fotografías de ovocitos tipo II. Se observan cuatro capas de células del cúmulo y un citoplasma homogéneo.

- Ovocitos tipo III: estos se encontraron parcialmente desnudos en sus células del cúmulo (Figura 4), de un total de 397 se obtuvo un promedio de 7/ovario.

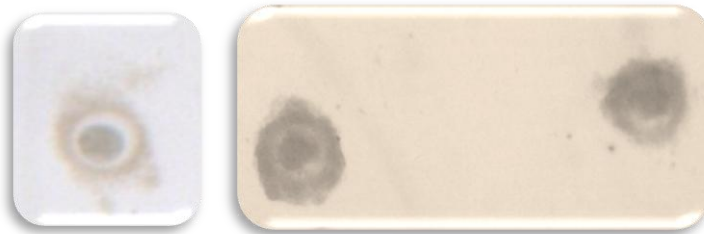


Figura 4. Fotografías de ovocitos tipo III, con una sola capa de células del cúmulo.

- Ovocitos tipo IV: estuvieron degenerados y totalmente desnudos (Figura 5), se encontraron 93 que corresponde a 1/ovario.

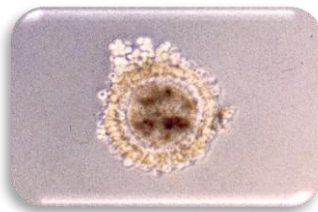


Figura 5. Fotografía de ovocitos tipo IV. Nótese el citoplasma degenerado.

Estos resultados se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro 4. Promedio y porcentajes de los ovocitos según el tipo.

Tipo	Total	Porcentaje	Promedio/ovario	Desviación estándar	CV
Ovocitos tipo I	386	27	6	4,35	72%
Ovocitos tipo II	457	36	8	4,54	57%
Ovocitos tipo III	1240	32	7	3,68	53%
Ovocitos tipo IV	93	5	1	3,50	35%
TOTAL	1333	100	22		

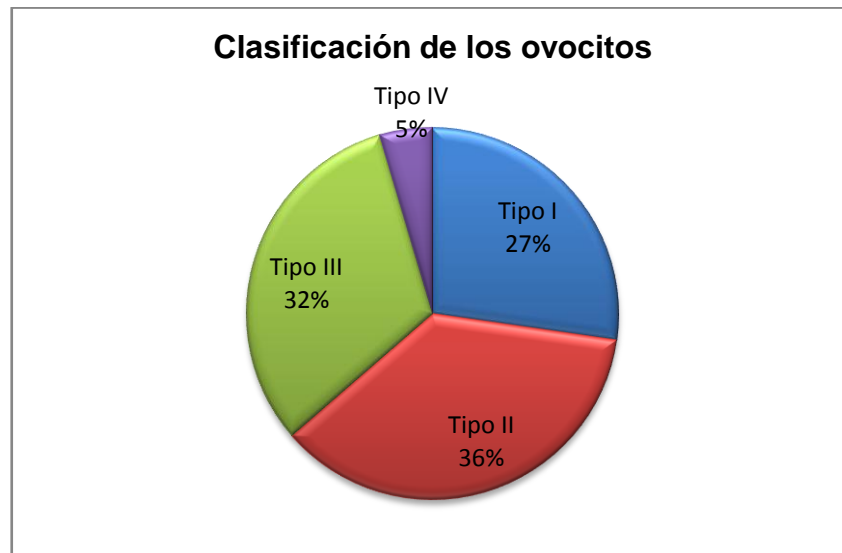


Figura 6. Porcentaje de ovocitos según el tipo

En la presente investigación, del 100% de ovocitos, el 27% correspondió a ovocitos tipo I; 36% ovocitos tipo II; y 32% ovocitos tipo III y 5% ovocitos tipo IV (Figura 6)

11.2.2. Viabilidad de los Ovocitos

De todos los ovocitos recuperados, se seleccionaron como aptos para el cultivo de maduración in vitro un 95%, que corresponde a 21 ovocitos por ovario. El 5% restante corresponde a ovocitos tipo IV o no viables, los mismos que se encontraron degenerados.

La amplitud de la variación del promedio total fue de 11 para el límite menor y 31 para el mayor. La desviación estándar (s) fue de 9,79; mientras que el coeficiente de variación de 47%.



Figura 7. Porcentaje de ovocitos viables por ovario

En la investigación del 100% de ovocitos viables, el 29% correspondió a ovocitos tipo I; 38% ovocitos tipo II; y 33% ovocitos tipo III. (Figura 7)

11.3. GRADO DE EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULO SEGÚN TIPO DE OVOCITOS Y MEDIO DE MADURACIÓN

11.3.1. Expansión de las Células del Cumulo de los Ovocitos Aptos Para FIV

Una vez que se determinó la calidad y viabilidad de los ovocitos, se aplicaron los medios de maduración correspondientes, de acuerdo al diseño establecido y a los resultados del grado de expansión, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 5. Porcentaje del grado de expansión de las células del cumulo en los tres tipos de ovocitos con dos medios de maduración

EXPANSIÓN	Tipo I		Tipo II		Tipo III	
	TCM %	HAMS %	TCM %	HAMS %	TCM %	HAMS %
Máxima	65,9	72,8	38,3	47,3	33,5	47,3
Media	11,0	11,5	29,1	16,1	24,4	12,1
Leve	0,0	6,4	17,0	27,0	15,4	18,5
No	23,1	9,4	15,6	9,6	26,8	22,1
Aptos para FIV	76,9	84,3	67,4	63,4	57,9	59,4
No aptos para FIV	23,1	15,7	32,6	36,6	42,1	40,6

Imágenes de los cuatro grados de expansión se presentan en el Anexo 6.

Los porcentajes de la expansión del cúmulo celular de ovocitos tipo I, II y III con la aplicación de los dos medios de maduración, así como la significación estadística se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Porcentaje de ovocitos expandidos aptos para Fertilización In Vitro (FIV), en los tipo I, II, y III, con los dos medios de maduración

Medio de maduración	Tipo de ovocito	Repeticiones										Porcentaje de ovocitos expandidos aptos para FIV	Ovocitos expandidos no aptos para FIV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
TCM-199	Tipo I	50,0	40,0	100,0	66,7	80,0	85,7	100,0	100,0	80,0	66,7	76,9 ^a	23,1 ^a
	Tipo II	80,0	69,2	50,0	33,3	68,8	66,7	87,5	90,0	75,0	53,3	67,4 ^b	32,6 ^b
	Tipo III	44,4	72,7	72,7	50,0	20,0	80,0	100,0	0,0	50,0	88,9	57,9 ^c	42,1 ^c
	Promedio	58,1	60,7	74,2	50,0	56,3	77,5	95,8	63,3	68,3	69,6	67,4	32,6
Ham's F-12	Tipo I	50,0	100,0	70,0	100,0	33,3	100,0	89,5	100,0	100,0	100,0	84,3 ^a	15,7 ^a
	Tipo II	33,3	72,7	54,5	50,0	100,0	0,0	90,0	100,0	66,7	66,7	63,4 ^b	36,6 ^b
	Tipo III	40,0	55,6	62,5	100,0	33,3	50,0	44,4	83,3	75,0	50,0	59,4 ^c	40,6 ^c
	Promedio	41,1	76,1	62,3	83,3	55,6	50,0	74,6	94,4	80,6	72,2	69	31

En el cuadro 6 se presenta el resumen del análisis de varianza de los porcentaje de ovocitos aptos para FIV obtenidos en los tres tipos de ovocitos con los dos medios de maduración con 10 repeticiones (ovarios), utilizando un arreglo factorial 2x3 (medios x tipos):

Cuadro 7. Análisis estadístico del porcentaje de ovocitos expandidos aptos para fertilización in vitro (FIV)

ADEVA

FV	GL	SC	CM	Fc	F 0,05	F0,01
Tratamientos	5	5412,9	1082,6	30,62**	2,4	3,41
Medios	1	35,4	35,4	0,01	4,03	7,17
Tipos	2	5049,6	2524,8	15,40**	3,18	5,06
Medios x tipos	2	328,0	164,0	0,24	3,18	5,06
Error	49	33652,0	686,8			
TOTAL	59	44477,9				

Existe diferencia estadística altamente significativa, entre tratamientos y entre tipos de ovocitos, y la interacción medios x tipos no es significativa; por lo tanto se puede decir que el efecto de los medios ha sido similar en cada uno de los tipos de ovocitos. Del mismo modo no se presentó diferencia estadística entre medios, sin embargo el medio Ham's fue ligeramente mayor con una pequeña diferencia que estadísticamente no se detectó. La prueba de Duncan de los tratamientos se la puede observar en el Anexo 7.

En la figura 8 se grafica el promedio del porcentaje obtenido con cada uno de los tratamientos de la expansión in vitro de los ovocitos tipo I, II y III.

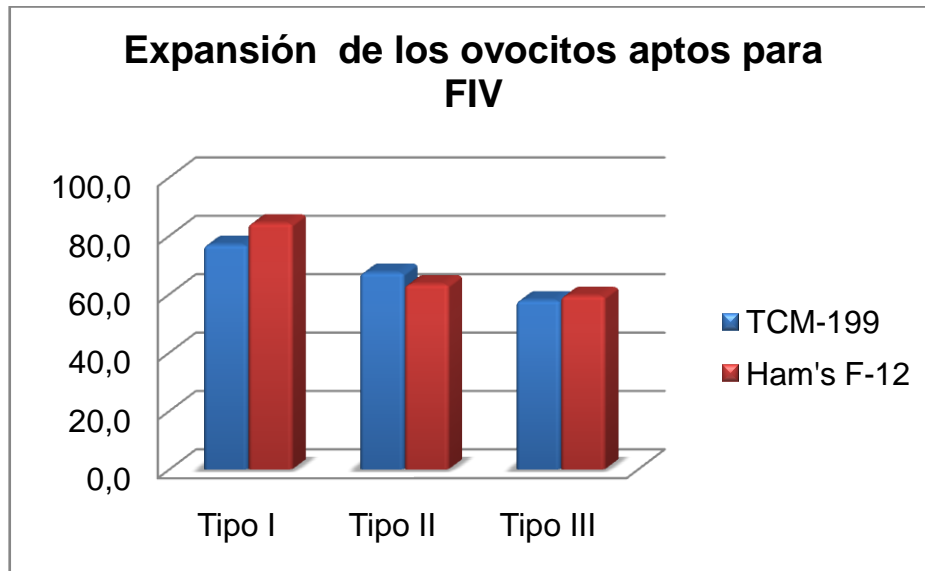


Figura 8. Expansión del cumulus celular de ovocitos aptos para FIV

El medio Ham's obtuvo los mejores resultados con los ovocitos tipo I y III; mientras que el TCM-199 fue superior con los ovocitos tipo II (Figura 8).

Como se detectó diferencia altamente significativa entre tipos se realizó la prueba de Duncan para comparación entre los porcentajes de expansión de los tres tipos de ovocitos (Anexo 8), los resultados se observan en el cuadro 8.

Cuadro 8. Porcentaje de ovocitos expandidos aptos para FIV de los tipos I, II y III

Tipos de ovocitos	Promedio
I	80,6 ^a
II	65,4 ^b
III	58,6 ^c

El porcentaje de ovocitos aptos para continuar el proceso de FIV es mayor en los ovocitos tipo I que en los II y III, y, el porcentaje de los ovocitos tipo II es mayor al de los III.

El promedio del porcentaje obtenido con cada uno de los tipos de ovocitos se grafica en la figura 9. Se nota claramente que los ovocitos tipo I y II tuvieron los mejores resultados independientemente del medio utilizado.

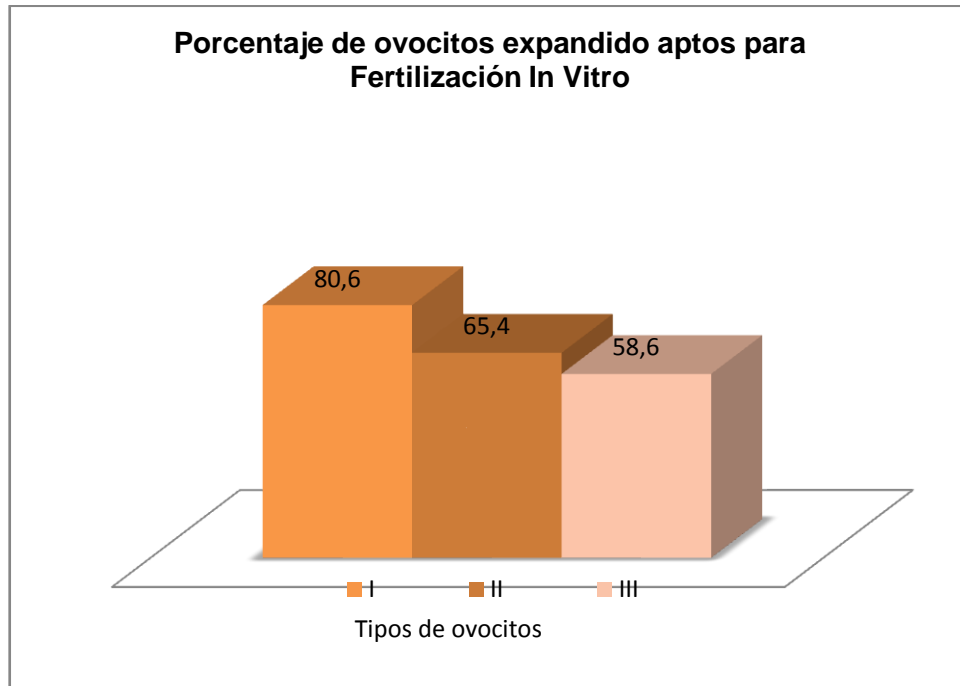


Figura 9. Promedio del porcentaje de ovocitos expandidos de los tipos I, II y III

12. DISCUSIÓN

12.1. NÚMERO DE OVOCITOS OBTENIDOS POR OVARIO

En nuestra experiencia el porcentaje de ovocitos/ ovario fue de 22, menor a los resultados reportados por Hamano y Kuwayama (1993), y Carolan y col. (1994), que fueron de 63,3 y 44,2 respectivamente, estos autores obtienen un elevado número de ovocitos debido al fino corte realizado en la superficie del ovario con un dispositivo diseñado con hojas de acero estériles dispuestas en forma paralela, lo que permitió un incremento de tres veces los resultados reportados. Por el contrario nuestros resultados fueron superiores a los datos logrados por Fernández y col. (2010), Hernández y col. (2009), y Velarde (2005) que fueron de 4, 7 y 4 respectivamente. Sin embargo los resultados de esta investigación se encuentran dentro de los rangos encontrados por Süß y col. (1988), y Lonergan y col. (1994) que varían entre 15 y 23 ovocitos/ovario.

La marcada variabilidad en el número de ovocitos es debido a las diferentes procedencias y condiciones de los animales que llegan al sacrificio en el matadero (Hernández y col. 2009), al igual que influencias de factores fisiológicos inherentes al animal, tales como: estado nutricional, raza, edad, patrones hormonales, entre otros (Gallegos 1998).

El elevado número de ovocitos se debe al método utilizado, ya que la incisión es tanto en la superficie ovárica como el interior. Este hecho deriva en liberación de ovocitos de folículos menores a 2 mm de diámetro, desventajosamente su capacidad de maduración in vitro es menor en comparación a los ovocitos obtenidos de folículos de mayor diámetro.

12.2. CALIDAD Y VIABILIDAD DE OVOCITOS.

12.2.1. Calidad de Ovocitos

En este ensayo se obtuvieron los siguientes resultados para ovocitos tipo I: 6 ovocitos/ovario que corresponde al 29%, este porcentaje coincide con Lonergan y

col. (1994) de 29% aunque es menor a los obtenidos por Carolan y col. (1994) que fue de 38,7 % y por Hamano y Kuwayama. (1994) que obtuvieron un 84,6%.

Con respecto a ovocitos tipo II en esta investigación se obtuvo un promedio de 8 ovocitos/ovario que corresponde a un 38%, inferior al porcentaje reportado por González (1992) que fue de 48,3%, y a la vez superior al porcentaje alcanzado por Lorenzo (1992) de 32, 2%.

Y para ovocitos tipo III se obtuvo un promedio de 7 ovocitos/ovario (33%), superior al porcentaje logrado por González (1992) de 10, 9% y de Lorenzo (1992) de 28,3%.

Estos resultados se deben al método de obtención de ovocitos que fue por disección de los folículos ováricos, ya que si bien es cierto este método tiene la ventaja de obtener un índice de recuperación elevado, posee dos desventajas: el tiempo empleado, ya que las condiciones de temperatura y pH varían hasta su introducción al medio de maduración; y la calidad de los ovocitos es menor a los obtenidos por aspiración folicular, Martino y col. (1992), atribuyen esta condición como un factor de la técnica de recuperación de poblaciones heterogéneas de ovocitos de todos los folículos pequeños en el estroma ovárico y que muchos de estos ovocitos no se han desarrollado.

12.2.2. Viabilidad de Ovocitos

En este estudio de viabilidad cultivable de ovocitos bovinos para su maduración in vitro, se obtuvo un rendimiento de 95% muy superior al porcentaje alcanzado por Hernández (2009), Fernández y col. (2010) y Velarde (2005) que fueron de 61,4%; 45,7%; y de 58,7%.

Los resultados obtenidos en esta investigación se deben a que se seleccionaron cuidadosamente los ovarios teniendo en cuenta que no exista la presencia de cuerpos lúteos, además de que se encontraban dentro de un rango de peso no muy variable, por el contrario con el método de corte de folículos se obtiene una mayor proporción de ovocitos ya que provienen de folículos menores de 2 mm de diámetro que se encuentran dentro del ovario.

12.3. GRADO DE EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CUMULO CON LOS DOS MEDIOS DE MADURACIÓN INVESTIGADOS.

Para el medio TCM-199 se logro un 67,4%, este resultado fue más alto que el presentado por Lorenzo (1992) y Jamil y col. (2007) de 45,6% y 62,28% respectivamente; a su vez fue menor a los datos obtenidos por Choi y col. (1998) que van entre un 80,6% y un 93,8%; pero fueron similares a los valores alcanzados por Hegab y col. (2009) de 68%.

En esta investigación se logro un 69% para el medio Ham's F-12, resultado que fueron superiores a los datos presentados por, Jamil y col. (2007) y Hegab y col. (2009) de 31,38% y 66,7% respectivamente. Y a su vez fueron similares a los resultados reportados por Sanbuissho y Threlfall (1989) de 69,9%.

Todos los autores complementaron sus medios con suero de vaca en estro (SVE), probablemente, las diferencias que se pueden observar con los resultados de otros autores, son al método de obtención y preparación del suero, ya que el SVE recogido en las horas inmediatamente posteriores al inicio de los síntomas psicósomáticos del estro, según Kruip (1988), tienen diferencias en las concentraciones de LH, progesterona, estradiol y de prolactina (Younis y col. 1989). La adición de estas hormonas ha justificado, en otros experimentos, un aumento de la maduración (Zuelke y col.1989; Fukui 1989) pero no así de prolactina (Younis y Brackett 1992). Por otro lado, tampoco señalan la aptitud ni la dieta de los animales utilizados para obtener el suero, lo cual puede también puede influir en las concentraciones hormonales de LH, progesterona y estradiol (Folman y col. 1983).

Por otro lado la diferencia entre medios fue de 1,6% siendo superior el medio Ham's F-12, no representa una diferencia significativa entre medios. El medio que más comúnmente es utilizado para la maduración in vitro de ovocitos es el TCM-199 (Wright y Bondioli 1981; Phillips 1988; Leibfried-Rutledge y col. 1989; Gliedt y col. 1996 a y b). Rose y Bavister (1992) realizaron un estudio en el que compararon 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.

Shamsuddin y col. (1993) mencionan que la degeneración de los ovocitos se inicia a las 30 h de incubación y este proceso involucra la desaparición del cuerpo polar, la elevada mucificación y la pérdida de los poros de unión o "gap junctions". Ellos concluyen que en bovinos, un periodo de 20 a 24 h de maduración es suficiente para completar este proceso, independientemente del tipo de medio que se utilice. En este sentido, los resultados obtenidos concuerdan con los autores citados. Por otro lado el tiempo del cultivo requerido para la maduración in vitro de los ovocitos hasta alcanzar el estadio de metafase II en bovinos, es variable y según los diferentes autores este tiempo puede oscilar entre 20 y 28 horas (Jagiello y cols. 1974; Süß y Wuthrich 1985; Xu y cols. 1986; Süß y cols. 1988; Fukui 1990).

13. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la evaluación de la expansión de las células del cumulo en la maduración in vitro de tres tipos morfológicos de ovocitos procedentes de ovarios de vacas de matadero de la ciudad de Loja con dos medios de maduración, permiten concluir que:

- Con la técnica utilizada se recuperó un elevado número ovocitos por ovario el cual fue de 22.
- El numero de ovocitos viables recuperados (95%) es alto, mientras la proporción de los tipos de ovocitos es similar a la de otros autores, 29% ovocitos tipo I, 38% ovocitos tipo II y 33% ovocitos tipo III.
- Los ovocitos tipo I y II obtuvieron el mayor grado de expansión y son aptos para continuar con el proceso de fertilización in vitro, mientras que los tipo III y IV no lo son.
- El grado de expansión de las células del cúmulo obtenido por ambos medios fue similar, sin embargo los resultados obtenidos con el medio Ham's F-12 fueron mayores a los reportados en la literatura, mientras que con el medio TCM-199 fueron similares a los alcanzados por otros autores.

14. RECOMENDACIONES

Es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- Cuando se realice la recolección de ovarios no utilizar ovarios con cuerpo lúteo ya que estos sangran mucho o en lo posible no diseccionarlos.
- Para la maduración in vitro trabajar solamente con ovocitos tipo I y II ya que estos logran mayor expansión de las células del cúmulo.
- Para maduración in vitro de los ovocitos trabajar ya sea con el medio Ham's F-12 como con el medio TCM-199.
- Continuar con las investigaciones sobre el proceso de producción in vitro de embriones que constan de las fases de: capacitación espermática, fecundación y cultivo-maduración embrionaria.

15. BIBLIOGRAFÍA

- Carolan C., Monaghan P., Gallager M., Gordon I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *theriogenology*. 1994Vol. 41, pp. 1061-1068.
- Hamano S. y Kuwayama M. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. 39:703
- F. Fernández Reyes, E. Hernández Pichardo, María del Carmen Reyes Flores. 2010. Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. Universidad autónoma metropolitana-xochimilco, México, D.F
- Mayela Patricia Gallegos de la Hoya. 1998. Fertilización in vitro de ovocitos bovinos. Universidad autónoma de Nuevo León
- Palma G. A y Brem O. 1993. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Buenos Aires, Argentina
- Martino A., Palomo M., Mogas T. y Paramio M. 1992. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization.
- Nicolás Velarde Choque. 2005. Recuperación de ovocitos recolectados de Vacas criollas post mórtem del sur del Perú. Perú.
- Eddy, E., S. Clark, J. Gong y B. Fenderson. 1981. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. Recuperado: 03-11-2010
- Palma G. A., Clement-Sengewald A. and Krefft H., 1993a. In Vitro Production of Cattle Embryos from Calf Oocytes. *Theriogenology*, 39: 278. Recuperado: 23-04-2010. Disponible en www.reprobiotec.com
- Byskov, A., 1982. Primordial germ cells and regulation of meiosis. En: *Reproduction in mammals*, editado por C. Austin, R. Sborn. Cambridge: Cambridge University. Recuperado: 23-10-2010
- Polanski, Z. y Kubiak, JZ., 1999. *Encyclopedia of Reproduction*. Meiosis. USA. Vol. 3. Pag 160-167.
- Zuckerman s., 1962. *The ovary*. New York. Vol. 1.

- Canipari R., 1994. Cell-cell interactions and oocyte growth. Zygote. Recuperado: 16-11-2010.
- Motlik J., Crozet N., Fulka J. y Flechon J., 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. Recuperado: 16-11-2010.
- Stromstedt M., y Byskov AG., 1999. Encyclopedia of Reproduction. Oocyte, Mammalian. USA. Edicion E. Knobil and JD. Neill. Vol. 3. Pag. 468-480
- Albertini DF. y Anderson E., 1974., The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. Recuperado: 16-11-2010
- Gilula N. B., M. L., Epstein y W. H. Beers. 1978. Cell to cell communication and ovulation: a study of the cumulus-oocyte complex. Recuperado: 11-11-2010
- Hunter M. G., 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. Recuperado: 11-11-2010
- Brankin V., Webb R. y Hunter MG., 1999. Factor(s) secreted by the porcine oocyte modulate granulosa cell growth and steroidogenesis. Resuperado: 11-11-2010
- Espey L. L., 1999. Encyclopedia of Reproduction. Ovulation. USA. Vol. 3. Pag. 605-614
- Moor R. M., Mattioli M., Ding J. y Nagai T. 1990. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. Recuperado 11-11-2010
- Motlik J., Fulka J. y Flechon JE., 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*. Recuperado: 11-11-2010
- Dekel N., 1989. Involvement of protein kinases in the induction of oocyte maturation in the rat. Recuperado: 11-11-2010
- Abeydeera LR., 2002. *In vitro* production of embryos in swine. Recuperado: 16-11-2010.
- Moor R.M. y G.M. Warnes. 1978. Regulation of oocyte maturation in mammals. Control of ovulation. London Butterworths. Pag. 159-176.
- Herradón P. G, Quintela L. A., Becerra J. J., Ruibal S. y Fernández M., 2007. Fecundación In Vitro: Alternativa para la Mejora Genética en Bovinos. Departamento de Patología Animal (Unidad de Reproducción y Obstetricia). Facultad De Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. Lugo.

España. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl. 1). 33: 40. Recuperado: 19-04-2010. Disponible en Pgarherr@Lugo.Usc.Es.

- Hyttel P., K.P. Xu, S. Smith, H. Callesen y T. Greve.- Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. Recuperado 16-11-2010
- Pavloc A., A. Lucas-Hann y H. Niemann. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Recuperado: 16-11-2010
- Yoon KW., Shin TY., Park JI., Roh S., Lim JM., Lee BC., Hwang WS. y Lee ES. 2000. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. Recuperado: 11-11-2010
- Xu K. P., Greve T., Callesen H. and Hyttel P., 1987. Pregnancy Resulting From Cattle Oocytes Matured and Fertilized In Vitro. J. Reprod. Fert. 81: 501-504. Recuperado: 22-04-2010.
- Lu K. H., Gordon I., MCGovern H. and Gallagher M., 1988a. Production of Cattle Embryos by In Vitro Maturation and Fertilization of Follicular Oocytes and their Subsequent Culture In Vivo in Sheep. Theriogenology. 29: 272. Recuperado: 10-04-2010

16. ANEXOS

Anexo 1. Composición del medioTCM-199 (EARLE)



SALES INORGÁNICAS

	mg/L
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	265
• $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,72
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200
• KCL	400
• $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$	50
• NaCl	6.800,00
• NaHCO_3	2.200,00
• $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	125

AMINOÁCIDOS

	mg/L
• L-Alanina	25
• L-Arginina.HCL	70
• L-Ácido Aspártico	30
• L-Cisteína.HCL.H ₂ O	0,11
• L-Cistina	26
• L-Ácido Glutámico	75
• L-Glutamina	100
• Glicina	50
• L-Histidina.HCL.H ₂ O	21,88
• Hidroxiprolina	10
• L-Isoleucina	20
• L-Lisina.HCL	70
• L-Fenilalanina	25
• L-Leucina	60
• L-Metionina	15
• L-Prolina	40
• L-Serina	25

• L-Treonina	30
• L-Triptofano	10
• L-Tirosina	57,7
• L-Valina	25

VITAMINAS

	mg/L
• Ácido Ascórbico	0,05
• Biotina	0,01
• Calciferol	0,1
• Pantotenato De Cálcio	0,01
• Cloruro De Colina	0,5
• Ácido Fólico	0,01
• Inositol	0,05
• Menadione	0,01
• Ácido Nicotínico	0,025
• Niacinamida	0,025
• Ácido P-Aminobenzóico	0,05
• Piridoxal.HCL	0,025
• Piridoxina.HCL	0,025
• Riboflavina	0,01
• Tiamina.HCL	0,01
• Acetato De Retinol	0,14
• Fosfato De Tocoferol Na	0.01

OTROS COMPONENTES

	mg/L
• Adenina.Sulfato	10
• Adenosina Trifosfato -2 Na	1
• Adenosina Monofosfato -Na	0,2
• Colesterol	0,2
• Deoxirribose	0,5
• Glucosa	1000.00
• Glutathiona	0,05
• Guanina.HCL	0,3
• Hipoxantina	0,3
• Rojo De Fenol	20
• Ribosa	0,5
• Xantina Na	0.344
• Timina	0,3
• Tween80	20
• Uracil	0,3

Anexo 2. Composición del medio Ham's F-12



SALES INORGÁNICAS

• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44,1
• $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0025
• $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,834
• KCl	285
• $\text{MgCl}_6\text{H}_2\text{O}$	123
• NaCl	7.599.000
• NaHCO_3	1.176,00
• Na_2HPO_4	142,04

AMINOÁCIDOS

• L-alanina	9
• L-arginina.HCL	211
• L-asparagina.H ₂ O	15,01
• L-ácido aspártico	13
• L-cisteína	35
• L-ácido glutámico	14,7
• L-glutamina	146
• Glicina	7,58
• L-histidina.HCl.H ₂ O	23
• L-iso-leucina	3.94
• L-leucina	13
• L-lisina	36.5
• L-metionina	4,48
• L-fenilalanina	5
• L-prolina	34.50
• L-valina	11,7

• L-Serina	10,5
• L-treonina	11,9
• L-triptófano	2,04
• L-tirosina	7,78

VITAMINAS

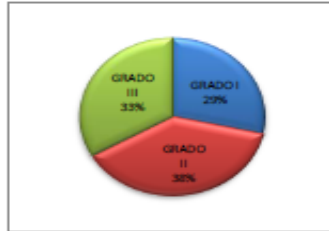
	mg/L
• Biotina	0,0073
• Pantotenato de Calcio	0,48
• Cloruro de colina	13.960
• Ácido Fólico	13.960
• Inositol	18.000
• Niacinamida	0.037
• Piridoxina.HCl	0,062
• Riboflavina	0,038
• Tiamina	0.340
• Vitamina B-12	1,36

OTROS COMPONENTES

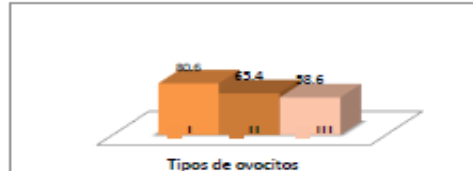
	mg/L
• Glucosa	1.802,00
• Hipoxantina	4
• Ácido Tiotico	0,21
• Ácido Lipoico	0,084
• Putrecina	0,161
• Rojo de Fenol	1,3
• Piruvato de Sodio	110
• Timidina	0,73

Anexo 3. Tríptico

b. Viabilidad de ovocitos



Se observa claramente que los ovocitos tipo I y II tuvieron los mejores resultados independientemente del medio utilizado.

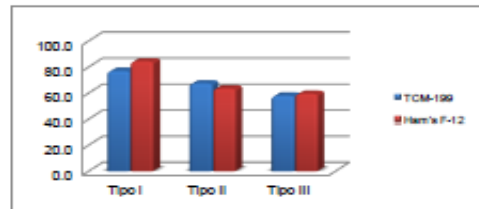


3. Grado de expansión de las células del cúmulo según tipo de ovocitos y medio de maduración

Existe diferencia estadística altamente significativa, entre tratamientos y entre tipos de ovocitos, y la interacción medios x tipos no es significativa; por lo tanto se puede decir que el efecto de los medios ha sido similar en cada uno de los tipos de ovocitos. Del mismo modo no se presenta diferencia estadística entre medios, sin embargo el medio Ham's fue ligeramente mayor con una pequeña diferencia que estadísticamente no se detecto.

Medio de maduración	Tipo de ovocito	Porcentaje de ovocitos expandidos aptos para FIV	Ovocitos expandidos no aptos para FIV
TCM-199	Tipo I	76,9*	23,1*
	Tipo II	67,9*	32,6*
	Tipo III	57,9*	42,1*
	Procedimiento	67,9	32,6
Ham's F-12	Tipo I	84,9*	15,7*
	Tipo II	63,9*	36,6*
	Tipo III	59,9*	40,6*
	Procedimiento	69	31

El medio Ham 's obtuvo los mejores resultados con los ovocitos tipo I y III; mientras que el TCM-199 fue superior con los ovocitos tipo II.



CONCLUSIONES

1. Con la técnica utilizada se recuperó un elevado número ovocitos por ovario el cual fue de 22.
2. El numero de ovocitos viables recuperados (95%) es alto, mientras la proporción de los tipos de ovocitos es similar a la de otros autores, 29% ovocitos tipo I, 38% ovocitos tipo II y 33% ovocitos tipo III.
3. Los ovocitos tipo I y II obtuvieron el mayor grado de expansión y son aptos para continuar con el proceso de fertilización in vitro, mientras que los tipo III y IV no lo son.
4. El grado de expansión de las células del cúmulo obtenido por ambos medios fue similar, sin embargo los resultados obtenidos con el medio Ham 's F-12 fueron mayores a los reportados en la literatura, mientras que con el medio TCM-199 fueron similares a los alcanzados por otros autores

RECOMENDACIONES

1. Cuando se realice la recolección de ovarios no utilizar ovarios con cuerpo lúteo ya que estos sangran mucho o en lo posible no diseccionarlos.
2. Para la maduración in vitro trabajar solamente con ovocitos tipo I y II ya que estos logran mayor expansión de las células del cúmulo.
3. Para maduración in vitro de los ovocitos trabajar ya sea con el medio Ham's F-12 como con el medio TCM-199.
4. Continuar con las investigaciones sobre el proceso de producción in vitro de embriones que constan de las fases de: capacitación espermática, fecundación y cultivo-maduración embrionaria.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Centro de Biotecnología Reproductiva Animal



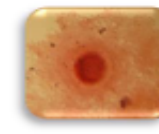
TESIS:

Evaluación de la Expansión de las Células del Cúmulo en la Maduración In Vitro de Tres Tipos Morfológicos de Oocitos Procedentes de Ovarios De Vacas de Matadero de la Ciudad de Loja con dos Medios de Maduración



RESPONSABLE:

Egda. Verónica L. González S.



DIRECTOR:

Dr. Lenin Aguirre Riofrío. Mg. Sc.



ASESOR:

Dr. Hermógenes René Chamba O.

Loja – Ecuador
2012

INTRODUCCIÓN



Las herramientas biotecnológicas en la producción animal ofrecen nuevas oportunidades para el desarrollo de una producción más sustentable y altamente competitiva a nivel mundial.

La producción in vitro (PIV) de embriones es la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos diez años y constituye un gran apoyo en el desarrollo de técnicas que tienen un potencial importante en la reproducción animal.

La producción de embriones in vitro implica una serie de procedimientos, que van desde la maduración de oocitos, capacitación espermática, fecundación de los gametos y finalmente el cultivo in vitro, para obtener blastocistos listos para implantarse.

A lo largo de los años se han estudiado innumerables protocolos para la PIV de embriones, cabe recalcar que en nuestro país aun no se ha realizado investigaciones acerca de esta biotecnología reproductiva animal, es por eso que se decidió estudiar el primer proceso que se debe cumplir dentro del protocolo, la maduración in vitro de oocitos bovinos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la expansión de las células del cúmulo en la maduración in vitro de tres tipos morfológicos de oocitos procedentes de ovarios de vacas de matadero de la ciudad de Loja con dos medios de maduración.

Objetivos Específicos:

- Identificar el número de oocitos obtenidos por cada ovario
- Identificar el número de oocitos viables
- Comparación del grado de expansión de las células del cúmulo con dos medios de

maduración In Vitro de oocitos bovinos: TCM-199 y Ham's F-12, en tres tipos morfológicos de oocitos: I, II y III.

- Difundir resultados obtenidos.

METODOLOGÍA

1. Recolección y transporte de ovarios

2. Obtención, Selección y Clasificación de Oocitos

- La clasificación morfológica fue la siguiente:
 - Tipo I: posee 6 o más capas células del cúmulo y citoplasma homogéneo
 - Tipo II: con 4-6 capas celulares, citoplasma con granulación más gruesas
 - Tipo III: una capa o parcialmente desnudos.

3. Recolección del suero de vaca en estro (SVE)

4. Maduración de los oocitos in vitro

- Se colocó gotas de 50 μ l del medio correspondiente, 5 μ l de SVE y una gota de aceite mineral
- Se colocó en la incubadora a 39° C, 5% de CO₂, 5% de O₂ y humedad relativa del 100% por 24h.
- A los oocitos expandidos se los colocó en portaobjetos y se los sumergió en solución fijadora durante 24h.
 - Se colocó una gota de tinte se cubrió con un cubreobjetos, se observó resultado en el microscopio con lente de 40X. La evaluación se basó en:
 - Expansión nula. No existe expansión apreciable del cúmulo.
 - + Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del oocito.
 - ++ Expansión apreciable, de unos dos diámetros del oocito.
 - +++ Expansión máxima, de más de tres diámetros del oocito, e incluso de las células de la corona radiada

5. Procedimiento para la evaluación de la expansión de oocitos con los medios de maduración

- Diseño Experimental
Para evaluar el efecto de los medios de maduración sobre la expansión de los oocitos se utilizó un arreglo

factorial 2 x 3 (medios de maduración x tipos de oocitos) dispuesto en un diseño completamente Randomizado, dando un total de seis tratamientos con diez repeticiones, en donde cada ovario se lo consideró como una unidad experimental.

FACTORES	NIVEL (Tipo de oocito)
Medios de Maduración	TCM-199
	Ham's F-12
Tipos de oocitos	Tipo I
	Tipo II
	Tipo III

RESULTADOS

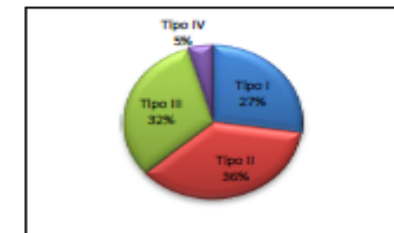
1. Número de oocitos por ovario

Se recuperaron 1333 oocitos en los 60 ovarios diseccionados, produciendo una media de 22 oocitos/ovario y un rango de 13 a 32, una desviación estándar (s) de 9,68; mientras que el coeficiente de variación (CV) de 44%.

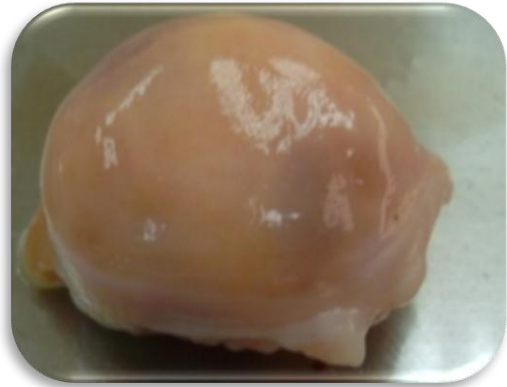
2. Calidad y viabilidad de oocitos

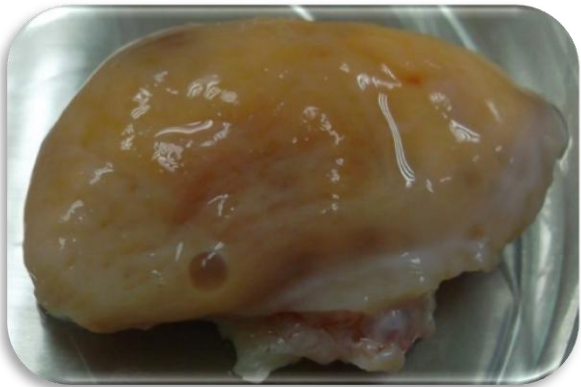
a. Calidad de oocitos

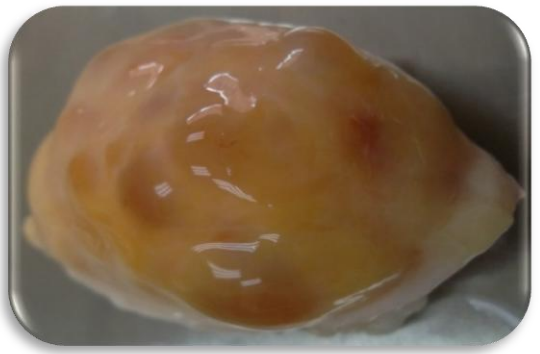
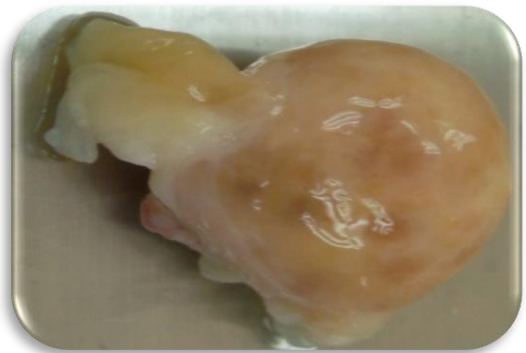
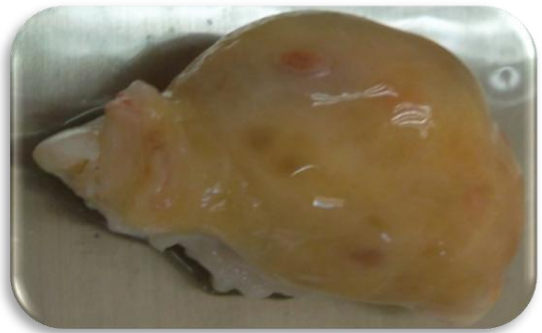
Tipo	Total	%	Prom./ ovario	Desviación estándar	CV
Oocitos tipo I	386	27	6	4,35	72%
Oocitos tipo II	457	36	8	4,54	57%
Oocitos tipo III	1240	32	7	3,68	53%
Oocitos tipo IV	95	5	1	3,50	35%
TOTAL	1333	100	22		



Anexo 4. Fotos de ovarios escogidos para maduración in vitro



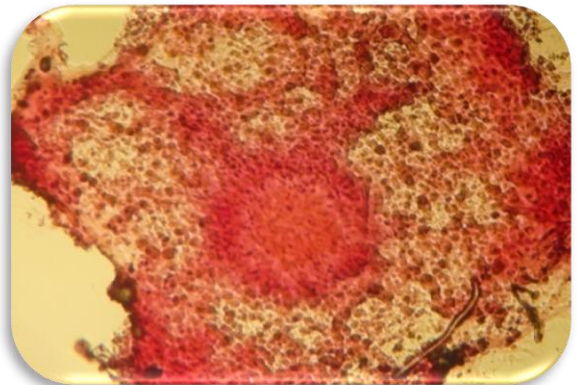
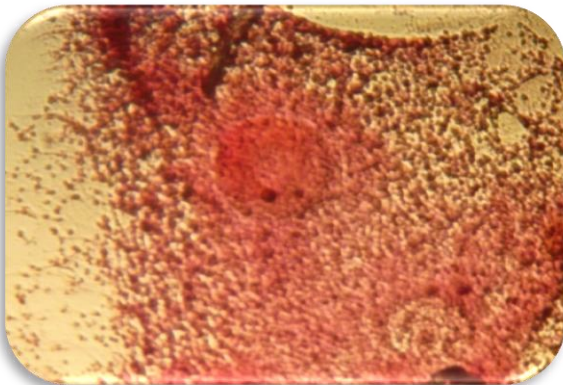
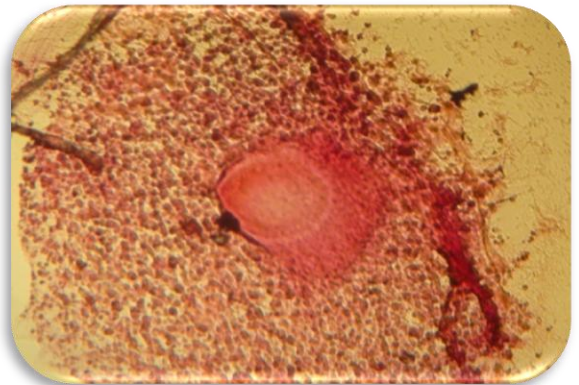
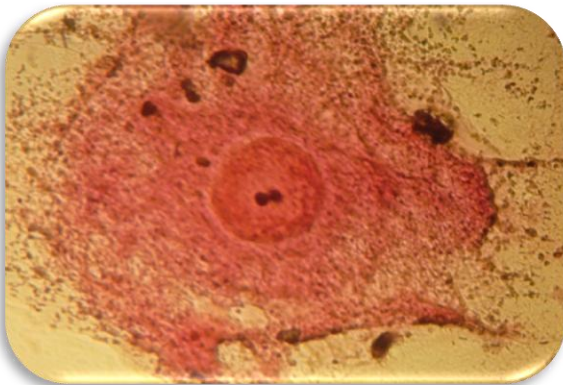
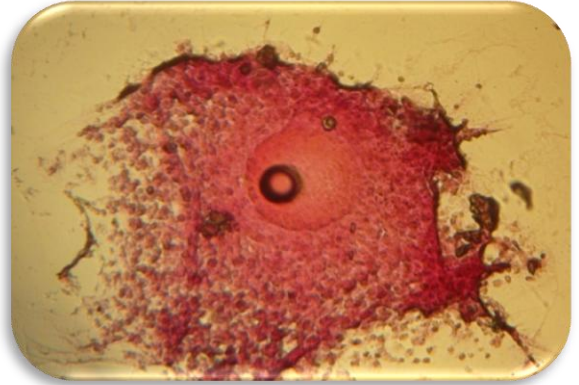
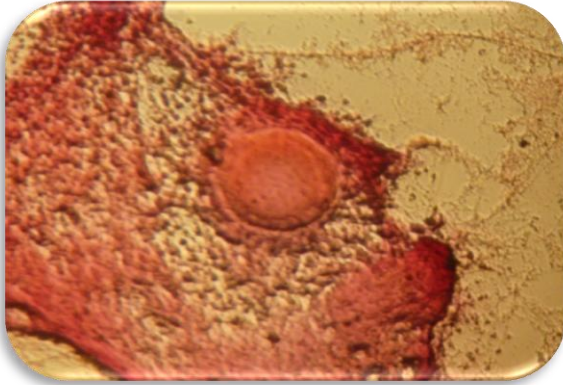




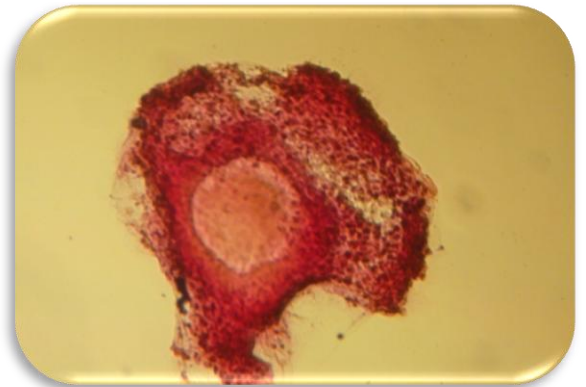
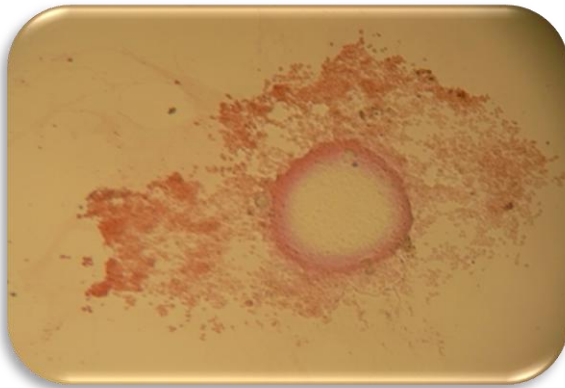
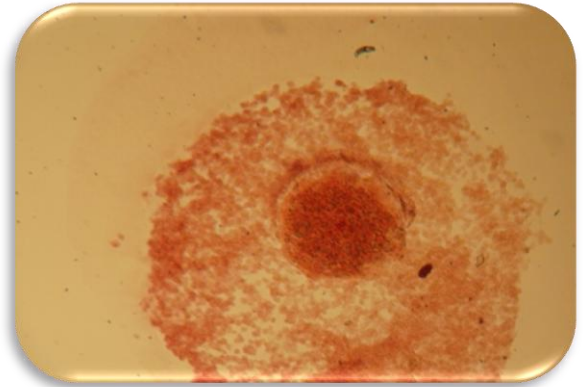
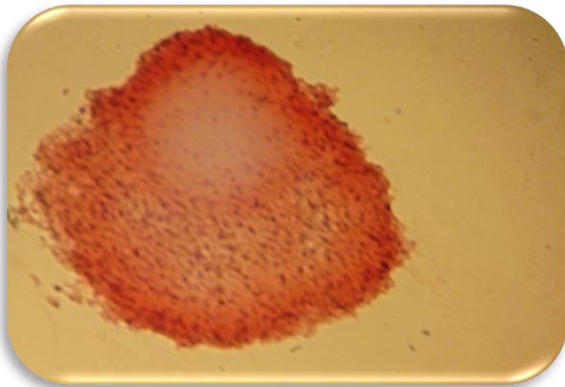
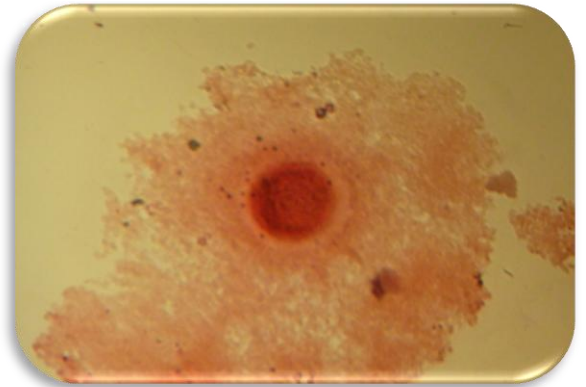
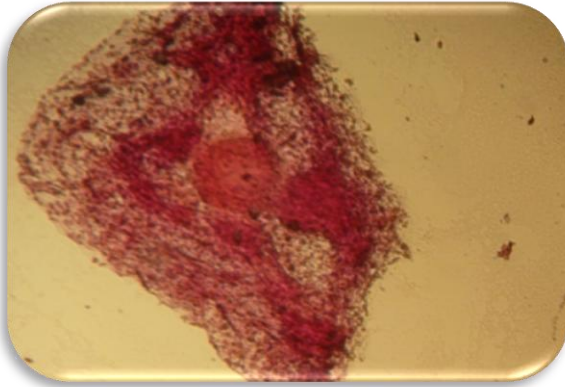
Anexo 5. Número de ovocitos de los tipos I, II, III y IV encontrados en cada uno de los 60 ovarios estudiados.

Ovarios	Tipo de ovocitos				Ovarios	Tipo de ovocitos				Ovarios	Tipo de ovocitos			
	I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV
1	4	16	7	2	21	7	7	9	1	41	14	3	10	0
2	5	7	9	3	22	4	14	11	0	42	11	11	7	0
3	4	14	11	0	23	4	3	11	0	43	10	11	16	2
4	3	3	11	1	24	6	5	4	2	44	8	4	3	1
5	5	5	4	3	25	2	6	5	6	45	3	3	3	0
6	7	17	10	2	26	4	8	5	0	46	1	1	2	0
7	2	6	5	6	27	5	10	4	6	47	19	10	9	0
8	4	8	4	1	28	3	4	1	2	48	4	7	6	3
9	5	10	4	6	29	5	2	2	1	49	12	6	6	3
10	3	4	1	2	30	9	8	9	0	50	6	6	8	0
11	5	15	7	2	31	4	7	3	0	51	14	3	10	0
12	3	5	7	1	32	11	22	9	1	52	8	14	9	0
13	4	13	8	1	33	10	11	16	2	53	10	11	16	2
14	4	14	11	0	34	8	4	3	1	54	8	4	3	1
15	6	3	4	4	35	3	3	3	0	55	3	3	3	0
16	8	16	10	2	36	1	1	2	0	56	1	1	2	0
17	2	6	5	6	37	19	10	9	0	57	19	10	9	0
18	4	8	4	1	38	4	7	6	3	58	4	7	6	3
19	5	10	4	6	39	12	7	6	2	59	12	7	8	0
20	3	4	1	2	40	6	6	8	0	60	6	6	8	0

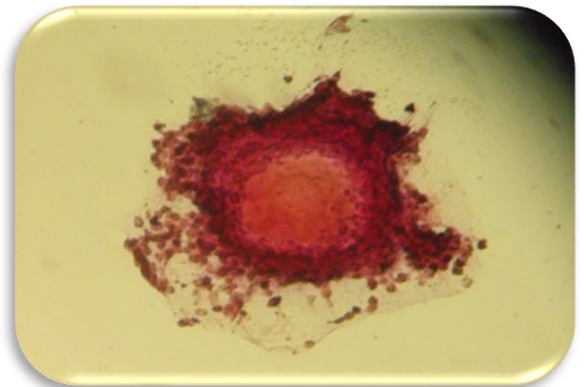
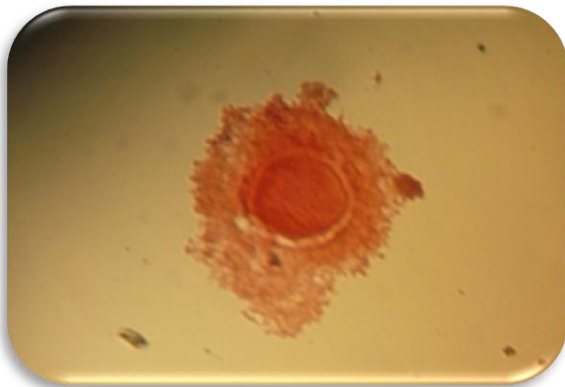
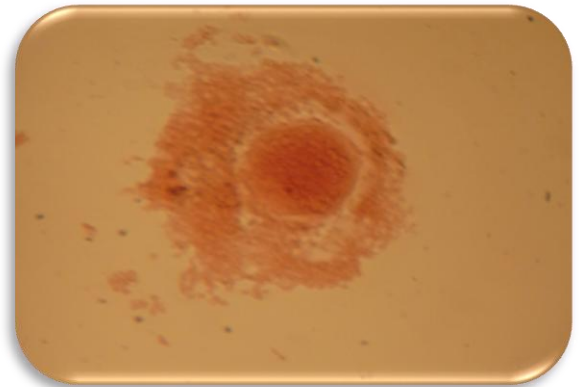
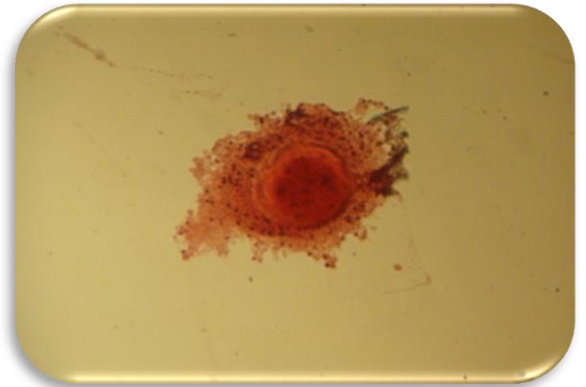
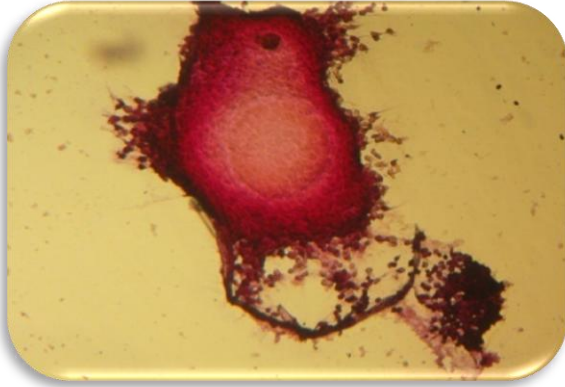
Anexo 6. Fotos de la expansión máxima de las células del cumulo con los dos medios de maduración



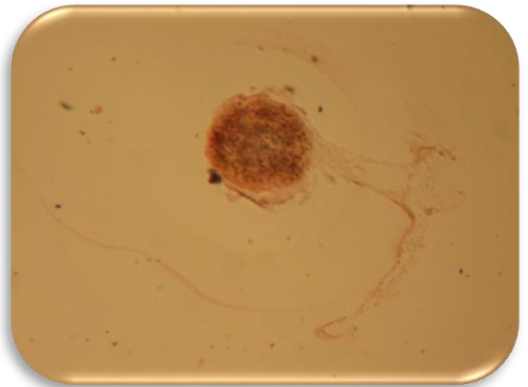
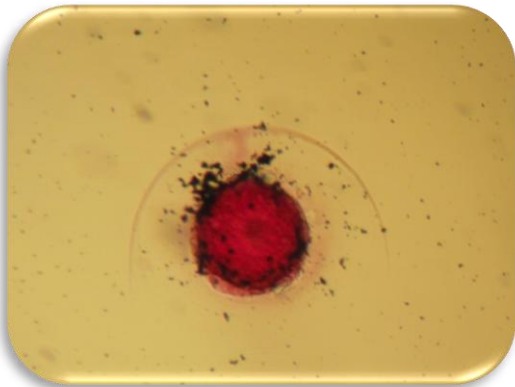
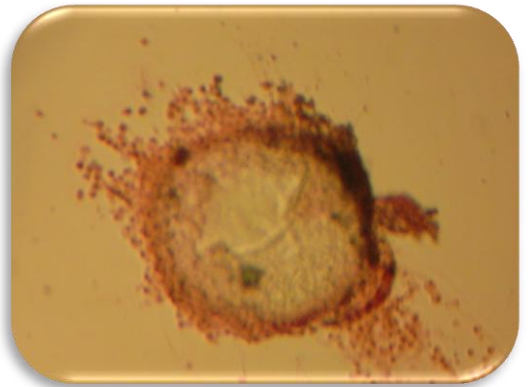
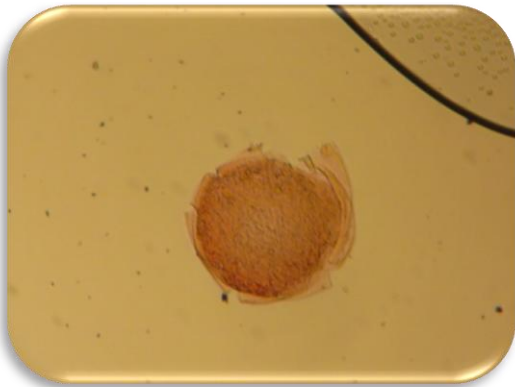
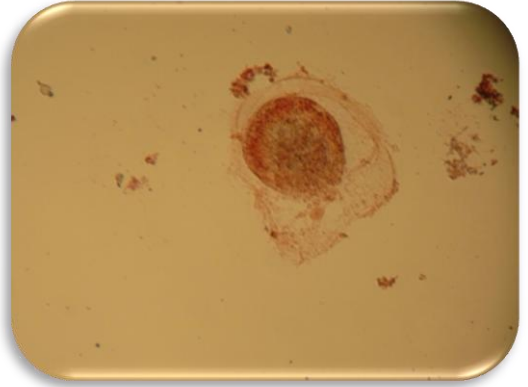
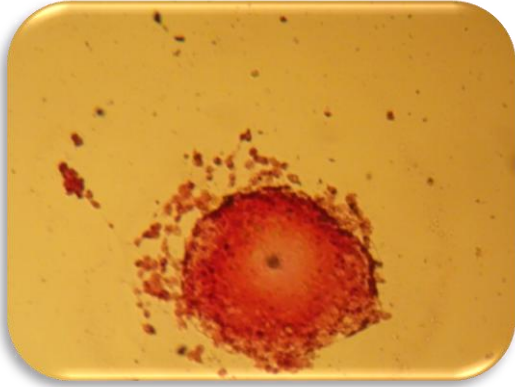
Fotos de la expansión media de las células del cumulo con los dos medios de maduración



Fotos de la expansión leve de las células del cumulo con los dos medios de maduración



Fotos de la no expansión de las células del cumulo con los dos medios de maduración



Anexo 7. Prueba de Duncan de los seis tratamientos aplicados.

VALORES P	2	3	4	5	6
0,05	2,84	2,98	3,08	3,15	3,2
0,01	3,78	3,94	4,05	4,13	4,2
0,05	4,3736	4,5892	4,7432	4,851	4,928
0,01	5,8212	6,0676	6,237	6,3602	6,468

D-A	7,4	AS
D-B	16,9	AS
D-E	20,9	AS
D-F	24,9	AS
D-C	26,4	AS
A-B	9,5	AS
A-E	13,5	AS
A-F	17,5	AS
A-C	19,0	AS
B-E	4,0	AS
B-F	8,0	AS
B-C	9,5	AS
E-F	4,0	AS
E-C	5,5	AS
C-F	1,5	NS

D	A	B	E	F	C
HAMS I	TCM I	TCM II	HAMS II	HAMS III	TCM III
84,3	76,9	67,4	63,4	59,4	57,9

Anexo 8. Prueba de Duncan de los tres tipos de ovocitos investigados.

valores de p	2	3	4	5	6
0,05	2,84	2,98	3,08	3,15	3,2
0,01	3,78	3,94	4,05	4,13	4,2
0,05	3,10	3,25	3,36	3,43	3,49
0,01	4,12	4,29	4,41	4,50	3,80

I - II	15,2	AS
I - III	21,95	AS
II - III	6,7	AS

I	II	III
80,6	65,4	58,6