

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Médica Veterinaria Zootecnista

TRABAJO EXPERIMENTAL:

“MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN
DIFERENTES”

AUTORA:

PRISCILLA SALOMÉ ESPIN VARGAS

TUTOR:

DR. FROILAN PATRICIO GARNICA MARQUINA

CUENCA - ECUADOR

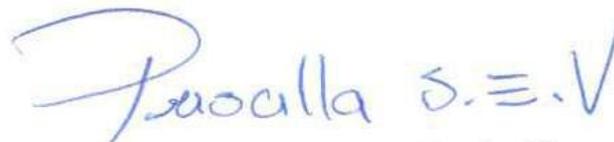
2018

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Priscilla Salomé Espin Vargas, con documento de identificación N°092006034-0, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: “MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN DIFERENTES”, mismo que ha sido desarrollado para optar por título de: Médica Veterinaria Zootecnista, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hago entrega final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, octubre del 2018.



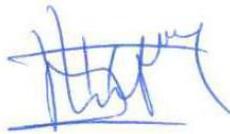
Priscilla Salomé Espin Vargas

C.I.: 092006034-0

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación “MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN DIFERENTES” realizado por Priscilla Salomé Espin Vargas, obteniendo el trabajo experimental, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, octubre del 2018.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Patricio Froilán Garnica Maquina', written over a horizontal line.

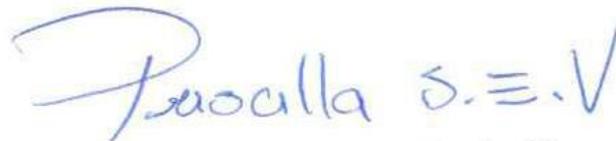
Dr. Patricio Froilán Garnica Maquina

CI.: 0101650299

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Priscilla Salomé Espin Vargas, con documento de identificación N°092006034-0, autora del trabajo de titulación “MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS CON DOS MEDIOS DE MADURACIÓN DIFERENTES” certifico que el total contenido del trabajo de experimental es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, octubre del 2018.

A handwritten signature in blue ink that reads "Priscilla S.E.V." with a large, stylized initial 'P'.

Priscilla Salomé Espin Vargas

C.I.: 092006034-0

DEDICATORIA.

A mi hijo Joaquín Alberto Villón Espin, y a mi madre Luz Albita Vargas Castillo, que con esfuerzo, paciencia, sacrificio y siendo testigos de mis avances me han permitido que alcance este sueño. Que Dios les bendiga siempre.

AGRADECIMIENTO.

Mi infinito agradecimiento a Dios por bendecirme y otorgarme salud y fortaleza en todo momento de mi vida.

Un sincero reconocimiento a la Fundación Charles Darwin, institución cuya invaluable labor encamina al Archipiélago de Galápagos hacia un desarrollo diferente, permitiendo la capacitación de los jóvenes galapagueños para la conservación de su Patrimonio Natural.

Inmensa gratitud a la Universidad Politécnica Salesiana de Cuenca, por otorgarme las facilidades para el desarrollo de los procedimientos de laboratorio.

Un especial reconocimiento al Doctor Patricio Garnica, tutor de tesis, que con paciencia y atención dirigió el proyecto hasta su culminación.

Un eterno agradecimiento a mi madre e hijo, que con esfuerzo, dedicación y apoyo constante, permitieron que culmine mi carrera profesional.

Finalmente, sin querer omitir nombres, infinitas gracias a todos los que participaron en esta investigación.

RESUMEN

El presente trabajo investigativo se desarrolló a 2550 msnm, coordenadas: latitud 2°54'08" S; longitud 79°00'19 O, en una temperatura promedio de 15°C, en el laboratorio de reproducción animal, Parroquia El Vecino, Cantón Cuenca, Provincia del Azuay-ECUADOR; cuya finalidad fue evaluar la maduración de ovocitos bovinos mediante la utilización de Suero de Vaca en Celo (SVC) y Suero Fetal Bovino (FBS). La investigación se realizó con 200 muestras de ovarios bovinos post-mortem, que fueron distribuidas en 2 tratamientos T1 y T2 con 100 ovarios en cada medio de maduración; los cuales fueron expuestos a las mismas condiciones de estudio, teniendo como diferencia solo los medios utilizados. El método que se utilizó fue el Inductivo Experimental, el análisis estadístico se realizó mediante la prueba: DBA con submuestras, asumiendo un p-value menor del 0,05 % como diferencia significativa. La recolección de datos para los indicadores a analizarse se realizó cada semana con 6 repeticiones. Para el indicador porcentaje de maduración, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos, esto mediante un p-value del 0,05%, con una media de maduración en el T2 de un 48,23 frente al T1 con 41,81, referente a un 54% y 46% respectivamente. Para el indicador número de ovocitos madurados el T1 obtuvo en sus categorías A 20,42; B 11,04 y C 10,35 frente al T2 con A 23,28; B 15,12 y C 9,83 resultando con un mayor número de ovocitos madurados al T2 en las categorías A y B y el T1 en la C.

ABSTRACT

The present investigative work was developed at 2550 masl, coordinates: latitude $2^{\circ} 54'08''$ S; length $79^{\circ} 00'19''$ W, at an average temperature of 15° C, in the laboratory of animal reproduction, Parish El Vecino, Canton Cuenca, Province of Azuay-ECUADOR; whose purpose was to evaluate the maturation of bovine oocytes by the use of Cow Wheat Serum (SVC) and Bovine Fetal Serum (FBS). The investigation was carried out with 200 samples of post-mortem ovarian bovines, which were distributed in 2 treatments T1 and T2 with 100 ovaries in each medium of maturation; which were exposed to the same conditions of study, having as a difference only the means used. The method used was the Experimental Inductive, the statistical analysis was performed by means of the test: DBA with subsamples, assuming a p value of less than 0.05% as a significant difference. The data collection for the indicators to be analyzed was done every week with 6 repetitions. For the percentage of maturity indicator, highly significant statistical differences were found among the treatments, this through of a p-value of 0.05%, with a mean of maturation in T2 of 48.23 against T1 with 41.81, referring to 54% and 46% respectively. For the indicator number of matured oocytes, T1 obtained in its categories A 20.42; B 11.04 and C 10.35 versus T2 with A 23.28; B 15.12 and C 9.83, resulting in a greater number of oocytes matured to T2 in categories A and B and T1 in C.

CONTENIDO GENERAL

I. CUERPO DEL TRABAJO ACADÉMICO	17
1.1. INTRODUCCIÓN	17
1.1.1. Obtención de los ovocitos.	18
1.1.2. Clasificación de los ovocitos.	18
1.1.3. Maduración de ovocitos.	18
1.1.4. Medios de cultivo <i>in vitro</i>	18
1.1.4.1. Suero fetal bovino.....	18
1.1.4.2. Líquido Folicular Bovino.	19
1.1.4.3. Suero de vaca en celo.	19
1.2. PROBLEMA.....	20
1.3. DELIMITACIÓN	21
1.3.1. Temporal.	21
1.3.2. Espacial.	21
1.3.3. Académica.....	21
1.4. EXPLICACIÓN DEL PROBLEMA	22
1.5. OBJETIVOS	23
1.5.1. Objetivo General:	23
1.5.2. Objetivos específicos:	23
1.6. HIPÓTESIS	23

	9
1.6.1. Hipótesis alternativa.....	23
1.6.2. Hipótesis nula.....	23
1.7. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	24
II. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL.....	25
2.1. APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINA.....	25
2.1.1. Anatomía y fisiología de los oviductos (trompas uterinas o de falopio).....	26
2.1.2. Anatomía y fisiología del ovario.....	27
2.1.2.1. Folículos ováricos.....	28
2.2. MADURACIÓN DE OVOCITOS IN VIVO	30
2.3. MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS BOVINOS	32
2.3.1. Recolección de ovarios en matadero.....	33
2.3.2. Métodos de obtención de los oocitos.....	34
2.3.2.1. Método de aspiración.....	34
2.3.2.1.1. Punción post-mortem del ovario con una jeringa.....	34
2.3.2.1.2. Punción in vivo del ovario con aguja.....	34
2.3.2.2. Método de disección.....	35
2.3.3. Selección y clasificación de los ovocitos.....	36
2.3.3.1. Selección de ovocitos.....	36
2.3.3.1.1. Selección según la valoración morfológica de los ovocitos.....	36
2.3.3.1.2. Selección según la morfología del ovario.....	37

	10
2.3.3.1.3. Selección según el diámetro folicular.....	37
2.3.3.1.4. Selección según el test azul cresil brillante (BCB).....	38
2.3.3.2. Clasificación de los ovocitos.....	38
2.4. TIEMPO DE CULTIVO Y TEMPERATURA EN LA MADURACIÓN OVOCITARIA.	39
2.5. MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS BOVINOS.....	41
2.5.1. Medio de cultivo tisular 199 (TCM 199).	41
2.5.2. Fluido sintético de oviducto SOF.....	42
2.5.3. Suplementación con Suero.....	42
2.6. COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	43
2.6.1. Parámetros biofísicos y elementos inorgánicos.	43
2.6.1.1. Osmolaridad.	43
2.6.1.2. pH.	43
2.6.1.3. CO ₂ y O ₂	43
2.6.1.4. El fluido oviductal.	44
2.6.1.5. El agua.	44
2.6.2. Componentes Orgánicos.	44
2.6.2.1. Fuentes de energía.	45
2.6.2.2. Fuentes de proteína.	46

2.6.2.2.1. Aminoácidos.....	46
2.6.2.2.2. Suplementación proteica.....	46
2.7. SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	47
2.8. REGULADORES DE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>	49
2.8.1. Hormonas.....	49
2.8.1.1. Gonadotropinas.....	49
2.8.1.2. Esteroides.....	50
2.8.1.3. Otras hormonas.....	51
2.8.2. Sistema adenosín mono fosfato cíclico “AMPc”.....	51
2.9. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SUERO SOBRE LA CANTIDAD Y CALIDAD DE LOS EMBRIONES PRODUCIDOS <i>IN VITRO</i>	52
2.9.1. Efectos negativos del suero.....	54
2.9.2. Consideraciones en los medios de cultivo: con y sin utilización de suero.....	55
2.9.3. Efecto del suero sobre la viabilidad de los embriones criopreservados.....	56
2.10. PROCEDIMIENTO PARA LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS BOVINOS.....	57
2.10.1. Maduración.....	57
2.10.2. Mañana de colección de oocitos.....	58
2.10.2.1. Preparación de los medios apropiados:	58
2.10.2.2. Preparación de los platos de maduración:	58

	12
2.10.3. Colección de oocitos.	59
2.10.3.1. Preparación del área de aspiración:	59
2.10.3.2. Prepare los ovarios para la aspiración:	59
2.10.3.3. Aspirar folículos:	60
2.10.4. Recuperación de oocitos.....	61
2.10.4.1. Preparación del área de recolección:	61
2.10.4.2. Filtrar fluido folicular.	62
2.10.4.3. Coloque el contenido del filtro en una placa Petri grande:.....	63
2.10.4.4. Recuperar ovocitos:	64
2.10.4.5. Lavar ovocitos:	64
2.10.4.6. Colocación de los ovocitos en gotas:.....	65
III. RESUMEN DEL ESTADO DE ARTE DEL ESTUDIO DEL PROBLEMA	67
3.1. MADURACIÓN IN VIVO DE OVARIOS.....	67
3.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE OVARIOS.....	67
3.3. MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE OVOCITOS	68
3.4. MEDIOS DE MADURACIÓN	68
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	69
4.1. MATERIALES	69
4.2. METODOLOGIA	73
4.2.1. Investigación de campo.....	73

	13
4.2.2. Trabajo en el Laboratorio.....	73
4.2.2.1. Preparación de los medios a utilizarse:	74
4.2.2.1.1. Preparación del medio de lavado de ovocitos.....	74
4.2.2.1.2. Preparación del medio de maduración de ovocitos.....	74
4.2.2.2. Preparación de los sueros en estudio:	75
4.2.2.2.1. Suero de vaca en celo (SVC).	75
4.2.2.2.2. Suero fetal bovino (FBS).	76
4.2.2.3. Proceso de preparación de ovarios para la aspiración de ovocitos.....	76
4.2.2.3.1. Lavado de ovocitos.	76
4.2.2.3.2. Maduración de ovocitos.....	77
4.2.2.3.3. Evaluación de ovocitos.	78
4.2.3. Diseño estadístico.....	78
4.2.3.1. Variables en estudio	78
4.2.3.1.1. Variables Dependientes.	78
4.2.3.1.2. Variables Independientes.	79
4.2.4. Análisis estadístico.....	79
4.3. POBLACIÓN Y MUESTRAS	80
4.3.1. Material experimental.	80
4.3.2. Selección de la muestra.	80
4.4. CONSIDERACIONES ETICAS	81

	14
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	89
5.1. DATOS DE MADURACIÓN T1 Y T2 OBTENIDOS EN EL LABORATORIO	89
5.2. TRANSFORMACIÓN DE DATOS.....	90
5.3. EVALUACIÓN POR CATEGORÍA DE OVOCITOS EN CADA TRATAMIENTO	841
5.4. ANÁLISIS MEDIANTE EL DISEÑO DE BLOQUES COMPLETAMENTE AL AZAR CON SUBMUESTRAS	87
5.5. ANÁLISIS DEL DISEÑO DE BLOQUES COMPLETAMENTE AL AZAR CON SUB MUESTRAS:	88
5.6. ANÁLISIS DE VARIANZA Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN.....	89
5.7. ANÁLISIS DE SIGNIFICACIÓN	91
5.7.1. Prueba de significación Duncan.....	91
5.8. MARCO LOGÍSTICO.....	95
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	97
6.1. CONCLUSIONES	97
6.2. RECOMENDACIONES.....	98
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
7.1. BIBLIOGRAFIA	99
7.2. LINGÜÍSTICA	107
VIII. APÉNDICES/ ANEXOS.....	109
IX. FOTOGRAFÍAS	110

Índice de Figuras

Figura 11. Aparato reproductor hembra bovina	26
Figura 2. Tránsito de los gametos masculino y femenino para la fecundación del oocito en la ampolla del oviducto.	27
Figura 3. Anatomía del ovario.....	28
Figura 4. Desarrollo folicular de la hembra bovina. FSH: Hormona Foliculoestimulante; LH: Hormona luteinizante.	29
Figura 5. Preparación de medios.	58
Figura 6. Aspiración de ovocitos.....	60
Figura 7. Jeringa Hamilton.	62
Figura 8. Punta pequeña estéril.....	62
Figura 9. Filtrado folicular	63
Figura 10. Lavado de oocitos	65
Figura 11. Disposición de medios para su consecutivo lavado	77
Figura 12. Evaluación de maduración ovocitaria de cada tratamiento según la categoría A. ...	84
Figura 13. Evaluación de maduración ovocitaria de cada tratamiento según la categoría B. ...	85
Figura 14. Evaluación de maduración ovocitaria de cada tratamiento según la categoría C. ...	86
Figura 15. Grafica de Nivel de significancia.....	90
Figura 16. Grafica de Coeficiente de Variación.....	90
Figura 17. Representación de las medias de los tratamientos en estudio.....	93
Figura 18. Porcentaje de las medias de cada tratamiento.	94

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Cambio del estado nuclear de ovocitos bovinos durante 24 horas de maduración in vitro.....	40
Cuadro 2. Análisis bioquímico del suero de novillo y fetal bovino de dos lotes distintos (CanSera International Inc. y Bocknek Lab).....	52
Cuadro 3. Materiales de oficina.....	69
Cuadro 4. Materiales de campo	70
Cuadro 5. Recursos humanos	72
Cuadro 6. Variable dependiente: Ovocitos.....	78
Cuadro 7. Variable independiente: Medios de maduración	79
Cuadro 8. Maduración ovocitaria T1. Suero de Vaca en celo –SVC- y T2. Suero Fetal bovino –FBS-.....	82
Cuadro 9. Datos obtenidos de cada tratamiento	83
Cuadro 10. Transformación de datos mediante $\sqrt{X+0,5}$	83
Cuadro 11. Análisis estadístico mediante el Diseño de Bloques con submuestras, con los datos transformados.	87
Cuadro 12. Análisis de varianza con los resultantes de análisis de DBA con sub muestras.....	89
Cuadro 13. Costos de la investigación.....	95

I. CUERPO DEL TRABAJO ACADÉMICO

1.1. INTRODUCCIÓN

La maduración *in vitro* de ovocitos en la biotecnología de la reproducción es una de las técnicas de mayor utilización e interés actualmente a nivel mundial, debido a sus características y propiedades.

Así lo corrobora Wani (2002) en donde menciona que se ha probado que la maduración *in vitro* de ovocitos es una técnica invaluable para la producción de un mayor número de embriones provenientes de animales de alto valor genético a un costo menor, que con el empleo de las prácticas convencionales de superovulación y producción de embriones (Vol. 44, pp. 89-95).

Fisiológicamente la maduración nuclear y citoplasmática ocurre *in vivo* durante el crecimiento folicular y la ovulación. Este desarrollo ovocitario va de la mano con la maduración folicular, siendo ambos procesos inducidos por cambios característicos en los niveles plasmáticos de las gonadotrofinas. La relación entre el ovocito y las células foliculares se modifica durante el período de maduración como resultado de cambios en la membrana del ovocito y el sistema de señales intercelulares (Moor, 1990).

Mientras que los ovocitos para la PIV se obtienen de folículos y de 2 a 6 mm de diámetro y tardan de 4 a 10 días para una posible ovulación, y a *in vivo* reanudan la meiosis de 15 mm de diámetro (Pavlok et al., 1992, Vol. 31, pp. 63-67).

En adición, el período de MIV es de 24h, mientras que el folículo dominante crece de 4 a 15 mm en aproximadamente 5 días. Por lo tanto, es posible decir que la heterogeneidad del desarrollo cromosómico del ovocito maduro refleja en la influencia de factores intrínsecos en el ovocito. Se sabe que el cambio del núcleo del ovocito ocurre durante el crecimiento final y su maduración así como, el crecimiento del folículo (Fair et al., 1996, Vol. 43, pp. 503-12).

1.1.1. Obtención de los ovocitos.

La obtención de los ovocitos se puede llevar a cabo por aspiración con jeringa o bien cortando el ovario, la aspiración se debe realizar en folículos superficiales mayores de 2mm, mientras que el método de corte consiste en colocar los ovarios en placas de Petri con medio de recolección de ovarios y cortar la superficie y el interior con un bisturí, haciendo cortes de 2mm de separación (Seneda et al., 2001, Vol. 67, pp. 37-43).

1.1.2. Clasificación de los ovocitos.

Se los ha clasificado por su estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cumulus. El diámetro de los ovocitos, que condicionan su capacidad para madurar de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 μm se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido la capacidad para madurar (Chen et al., 2001, Vol. 16, pp. 2350- 2356).

1.1.3. Maduración de ovocitos.

Martinez (2013) indica que la maduración ovocitaria se la efectúa separando en distintos pocillos los ovocitos dependiendo de la calidad de los mismos, y tras 24 horas en la estufa obtenemos unos resultados de maduración.

1.1.4. Medios de cultivo *in vitro*.

1.1.4.1. Suero fetal bovino.

Tiene efecto deletéreo de la presencia de suero fetal en la maduración *in vitro* de oocitos bovinos (no criopreservados) sobre su potencial de membrana mitocondrial, al igual que sobre su tasa de desarrollo embrionario. El SFB es el más deficiente para la maduración de oocitos,

como se ha demostrado en varios trabajos, pero con mejores porcentajes durante la FIV (Mucci & Aller, 2006, Vol. 2, p. 38).

1.1.4.2. Líquido Folicular Bovino.

La adición de Fluido folicular bovino (FFB) al medio de maduración puede ser requerida para inducir tanto la maduración nuclear como citoplasmática in vitro de ovocitos inmaduros de bovino (Ocaña & Moreno, 1997, Vol. 173, pp. 51-59).

1.1.4.3. Suero de vaca en celo.

El suero junto con la albúmina bovina es el complemento orgánico más importante de los medios. Aunque ciertos cultivos celulares requieren de suero como complemento. (Pinyopummintr & Bavister, 1994, Vol. 41, pp. 1241-1249).

1.2. PROBLEMA

La biotecnología de la reproducción ha llegado a establecerse en la actualidad como una de las áreas de mayor investigación, manejo y trabajo de la Medicina Veterinaria y Zootecnia, sus avances son cada vez muy relevantes en comparación a las otras ciencias. Una de ellas es la maduración *in vitro* de ovocitos que si bien es cierto es una nueva técnica, hasta la actualidad ya cuenta con diferentes estudios y conclusiones muy valederos. Dentro de lo que es la maduración ovocitaria como sabemos *in vivo* fisiológicamente esta necesita atravesar diferentes sucesos, en los cuales intervienen ciertos compuestos, químicos y hormonas, por lo cual el establecer un medio de maduración *in vitro* propicio para los ovocitos es de mucha importancia, ya que del medio elegido dependerá el porcentaje de maduración ovocitario que se tenga.

Debido a esto se ha visto la necesidad de realizar un estudio para evaluar la maduración de ovocitos bovinos con dos medios de maduración diferentes, el primero es mediante la utilización de suero de vaca en celo frente a uno con suero fetal bovino, para de esta manera obtener conclusiones sobre el comportamiento de cada medio y así poder valorar quien es el que mejor índice de maduración *in vitro* ovocitario demuestra.

Vale resaltar que en el Ecuador existen pocas investigaciones sobre la maduración *in vitro* de ovocitos, por lo cual la presente investigación se orienta a generar una base provechosa dentro del área de la biotecnología de la reproducción.

1.3. DELIMITACIÓN

1.3.1. Temporal.

La presente investigación tuvo una duración de 400 horas, distribuidas en el proceso experimental y redacción final.

1.3.2. Espacial.

El presente trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Reproducción de la Universidad Politécnica Salesiana, en la Ciudad de Cuenca, Provincia de Azuay, cuyas coordenadas son: latitud 2°54'08" S; longitud 79°00'19 O; altitud 2.550 msnm aproximadamente; temperatura 15°C; humedad relativa de 75%.

1.3.3. Académica.

El presente trabajo de investigación fue realizado en la rama de la zootecnia, referente a biotecnología de la reproducción, enfocada al porcentaje maduración ovocitario mediante la utilización de dos medios diferentes.

1.4. EXPLICACIÓN DEL PROBLEMA

El avance tecnológico en biotecnología de la reproducción en la actualidad ha logrado llegar al punto de realizar la maduración *in vitro* de ovocitos, por lo cual el utilizar un medio propicio para lograr un mayor índice de maduración ovocitario es tema de mucho interés y generador de varias investigaciones, ya que esta es la base para poder obtener ovocitos propicios para fecundar o criopreservarse.

Con la presente investigación se buscará evaluar que la incorporación de los dos diferentes medios de maduración en las diferentes etapas en el cual se encuentren los ovocitos bovinos, brindará la oportunidad de hacer una maduración *in vitro* los mismos que podrían ser utilizados para fecundación *in vitro*, siendo futuramente la producción de embriones de una manera más sencilla mejorando la genética animal obteniendo ganado sin riesgos de transmisión de enfermedades y una mayor producción y menor pérdida en el mercado.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo General:

- Evaluar la maduración de ovocitos bovinos mediante la utilización de Suero de Vaca en Celo (SVC) y Suero Fetal Bovino (FBS).

1.5.2. Objetivos específicos:

- Evaluar la maduración de los ovocitos bovinos.
- Determinar el medio de maduración con mayor eficiencia

1.6. HIPÓTESIS

1.6.1. Hipótesis alternativa.

Los medios T1 SVC y T2 FBS presentan diferencia en su capacidad de maduración ovocitaria.

1.6.2. Hipótesis nula.

Los medios T1 SVC y T2 FBS no presentan diferencia en su capacidad de maduración ovocitaria.

1.7. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

El presente trabajo experimental está enfocado a generar conclusiones válidas y coherentes, para así poder recomendar los resultados obtenidos de manera fluida y transparente; ayudando de esta manera a la industria Biotecnológica de la reproducción a optar por un medio de maduración ovocitario con excelentes niveles, propiedades y resultados.

Por otro lado la biotecnología de la reproducción como tal es una actividad pecuaria que tiene un alto potencial para seguir creciendo cada vez más, lo que genera a la comunidad científica a investigar y mejorar nuevas opciones (medios) para obtener ovocitos mucho más viables y con mínimos inconvenientes ya sea para fecundar o criopreservar.

La investigación aquí presentada generará información acerca del índice de maduración ovocitaria utilizando dos medios diferentes, lo cual en muchas investigaciones se recomienda profundizar; es decir, será de gran ayuda para aportar a las investigaciones y experimentos de laboratorio que hoy en día tiene todavía controversia en el mundo entero.

II. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

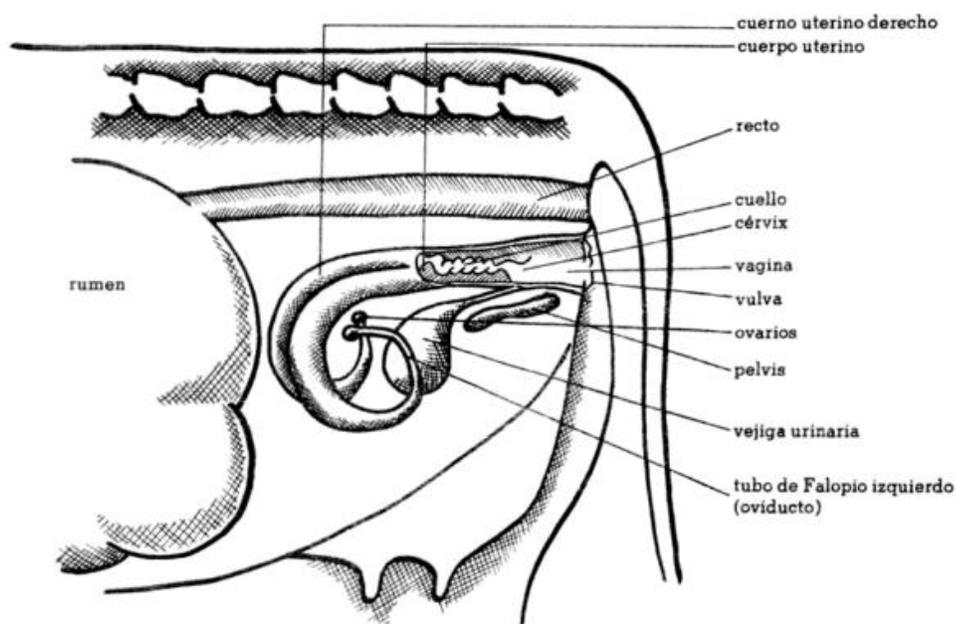
2.1. APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINA

El aparato reproductor de la hembra consta de las siguientes estructuras:

En primer lugar tenemos a los ovarios que son los encargados de producir óvulos y las hormonas estrógenos, progesterona y posiblemente relaxina, luego tenemos al oviducto quien es el que recibe al ovulo después de la ovulación y es el lugar donde ocurre la unión entre el óvulo y el espermatozoide, produciendo la fecundación. El oviducto transporta los espermatozoides al sitio de la fecundación y posteriormente el óvulo fecundado al útero, quien es la siguiente estructura y la encargada del transporte, por contracciones musculares, de los espermatozoides al oviducto, así como facilitar la implantación del ovulo fecundado y asegurar la supervivencia del embrión mediante una nutrición adecuada por secreciones uterinas antes de la implantación. El útero también ejerce la función de establecer un transporte de nutrientes al feto a través de la placenta por la relación materno- fetal, expulsión del feto y de la placenta durante y después del parto (Castro, 1984, pp. 143-144).

A continuación, tenemos al cérvix (cuello del útero), quien es el responsable de proteger al útero de la entrada de cuerpos extraños que puedan causar infecciones al útero no preñado y abortos del útero preñado. El canal del cérvix está parcialmente obstruido por cuatro pliegues o anillos de tejido y queda tapado por el moco cervical que es gelatinoso (entre celos o durante la preñez) y acuoso y abundante alrededor del celo. Luego del cérvix la siguiente estructura es la vagina, la misma que recibe al semen en caso de servicio natural, a más de conducir la orina desde el orificio de la uretra hacia afuera. El aparato femenino termina con una abertura externa, denominada vulva, la cual continúa con la piel del animal (Castro, 1984, pp. 143-144).

Figura 11. Aparato reproductor hembra bovina



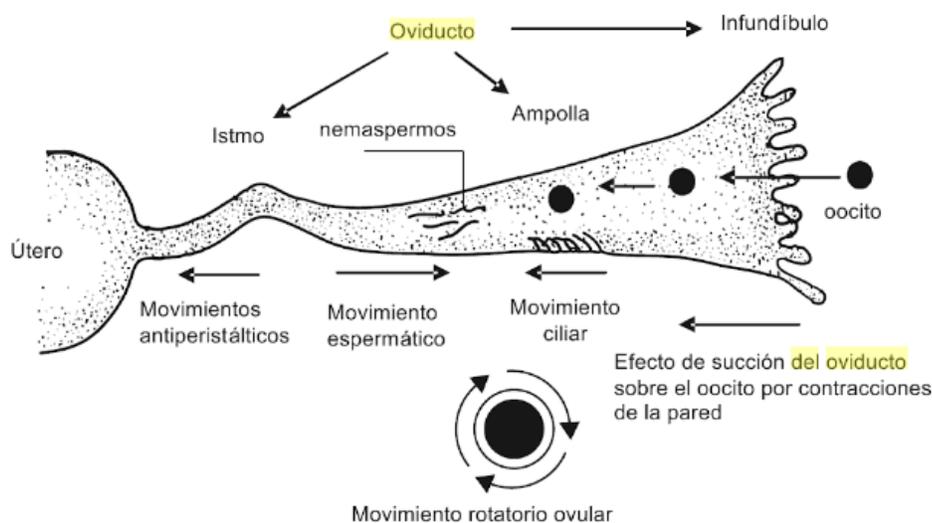
Fuente: (Castro, 1984, pp. 143-144)

2.1.1. Anatomía y fisiología de los oviductos (trompas uterinas o de falopio).

Urroz (1991) define a los oviductos como son dos conductos sinuosos que trasladan al óvulo de cada ovario hacia los cuernos uterinos. Es en ellos donde ocurre la fecundación del óvulo por parte del espermatozoide. La porción de cada oviducto adyacente al ovario respectivo, se despliega en forma de embudo, razón por la cual se le denomina infundíbulo y sus bordes en forma de flecos reciben el nombre fimbrias, y son las responsables de encauzar el óvulo en su trayecto dentro de cada oviducto. Durante la época de celo y antes del parto, su epitelio interno no ciliado, pasa por una fase intensa de secreción. El resto de las paredes del oviducto están constituidas por tejido conectivo, una capa de tejido muscular liso y una capa externa de tejido seroso cubierto de peritoneo (pp. 200-206).

La siguiente estructura del oviducto se le denomina ampolla tubárica y es el lugar destinado a la fecundación; por último se encuentra el istmo estructura que une la ampolla al cuerpo uterino (Álvarez et al., 2009, pp. 91-113).

Figura 2. Tránsito de los gametos masculino y femenino para la fecundación del oocito en la ampolla del oviducto.



Fuente: (Álvarez et al., 2009, pp. 91-113).

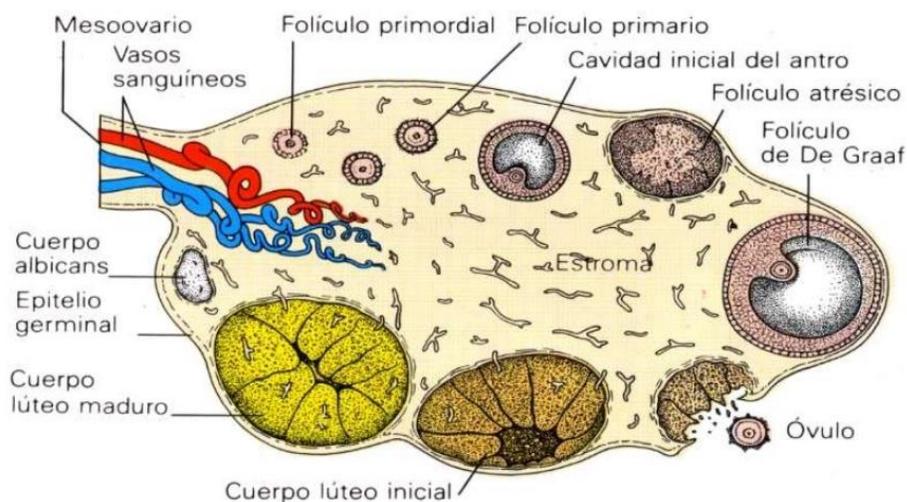
2.1.2. Anatomía y fisiología del ovario.

El ovario es el órgano principal en la reproducción de la hembra, el cual cumple funciones de producción y liberación del óvulo y liberación del estrógeno y la progesterona, hormonas encargadas de la regulación del ciclo estral y la gestación. Los dos ovarios de la vaca tienen forma ovalada y están ubicados en la cavidad abdominal (Ruiz et al., 2015, pp. 1-10).

Cada ovario consta de médula y corteza envueltas por la túnica albugínea y el epitelio superficial. La médula es la porción media del ovario y es la encargada de sostener el sistema vascular y nervioso. Envolviendo la médula está la corteza, la cual es un denso estroma del tejido conectivo donde se sitúan los folículos, cuerpos lúteos, cuerpos hemorrágicos, cuerpos albicans y folículos atrésicos. En el epitelio superficial es donde se forman las células germinales

en la etapa embrional de la vaca y por esta razón también se le conoce como epitelio germinal. La túnica albugínea es la encargada de soporte externo del ovario (Ruiz et al., 2015, pp. 1-10).

Figura 3. Anatomía del ovario.



Fuente: <http://geneticaselecta.net>

2.1.2.1. Folículos ováricos.

Álvarez et al., (2009) mencionan que en los mamíferos, la hembra no desarrolla mitosis de la célula germinal después que se produce el nacimiento, por lo que los ovocitos disponibles en este momento representan la cantidad disponible durante toda la vida reproductiva (pp. 91-113).

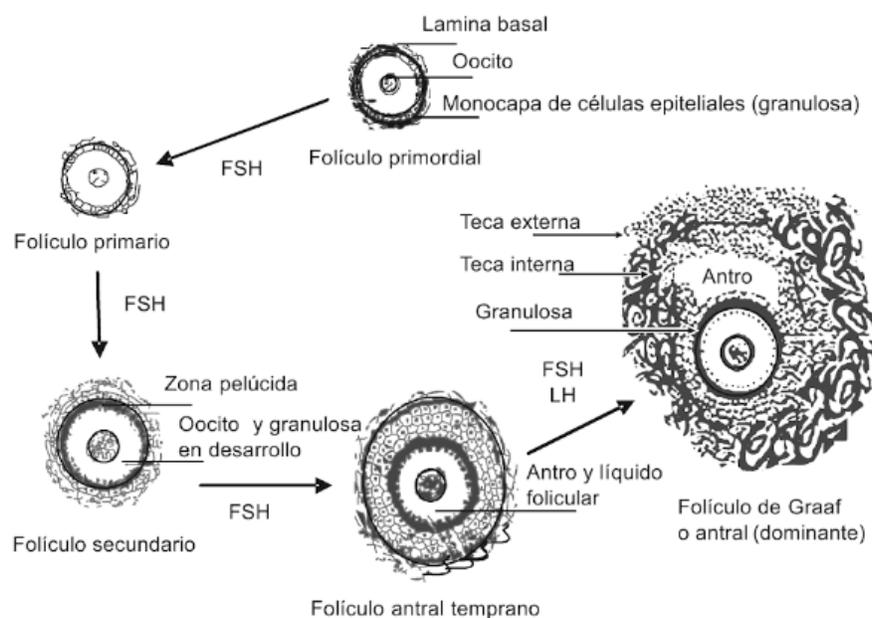
Durante el desarrollo temprano del feto en el ganado bovino, la ovogonia se desarrolla a partir de las células germinales que migran al ovario, proliferando aproximadamente del día 50 al 130 de la gestación. Ello se acompaña de un proceso de degeneración, siendo la mayor parte de los ovocitos eliminados de la superficie ovárica, antes del parto. Paralelamente, en el feto, la ovogonia comienza un proceso de meiosis que se detiene en la fase de diploteno, dando lugar finalmente al folículo primordial cuya población en la superficie del ovario sufre un proceso

continuo e irreversible de desarrollo y atresia conocido como foliculogénesis (Álvarez et al., 2009, pp. 91-113).

Ruiz et al., (2015) expresa que la foliculogénesis es un proceso continuo en el cual las células del folículo primordial se van transformando y van proliferando dando origen al folículo primario y posteriormente al folículo secundario que luego se convierte en folículo antral. Este proceso ocurre por la presencia de hormonas gonadotrópicas y se produce en forma de ondas a lo largo de la vida del animal (Ruiz et al., 2015, pp. 1-10).

Acotando al contexto anterior Álvarez et al., (2009) señala que desde el punto de vista morfológico y funcional, los folículos presentes en la superficie del ovario pueden clasificarse en tres grupos: folículos primordiales o unilaminares; folículos en crecimiento -primario, secundario y antral temprano- y folículos de Graaf (pp. 91-113).

Figura 4. Desarrollo folicular de la hembra bovina. FSH: Hormona Foliculoestimulante; LH: Hormona luteinizante.



Fuente: (Álvarez et al., 2009, pp. 91-113).

Álvarez et al., (2009) a su vez explican que el desarrollo folicular constituye un proceso dinámico que se caracteriza por la estimulación continua de folículos inactivos en activos y la atresia (atrofia) de ambos. No se conocen a ciencia cierta las causas que determinan el desarrollo de los folículos primordiales inactivos, al menos en las primeras etapas (pp. 91-113).

En el ganado bovino, la superficie ovárica presentan unos cuantos miles de estos folículos y su desarrollo a folículo primario activo se produce a intervalos regulares durante la vida fetal, alcanzando aproximadamente, a mediados de la gestación, la cifra de 2 millones, luego, una cantidad importante sufre atresia y se estima una cifra de 75 mil en el neonato (recién nacido) y de 25 mil en la vaca con 15 años edad. Estas cifras son controversiales, si tenemos en cuenta que, en otros casos, se informó 150 mil folículos en la etapa neonatal y una reducción hasta mil en vacas con edades comprendidas entre 15 y 20 años. Estas diferencias pudieran estar influidas por múltiples factores extrínsecos e intrínsecos, pero lo cierto es que, en otras especies, también se produce igual reducción, por atresia continua en función de la edad. De lo anterior se deduce que solo una pequeña fracción de la población folicular será susceptible de desarrollarse a partir de la pubertad y durante la vida reproductiva de la hembra (Álvarez et al., 2009, pp. 91-113).

2.2. MADURACIÓN DE OVOCITOS IN VIVO

La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo, durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de profase de MI hasta el de MII (maduración nuclear). El ovocito completa la meiosis en respuesta al pico ovulatorio de la hormona luteinizante (LH), o bien, cuando es retirado del folículo para llevar a cabo la maduración *in vitro*. Un periodo de 24 horas es necesario para que el ovocito bovino complete la maduración nuclear, es decir, alcance el estadio de MII, en el que permanece hasta el momento en que es fertilizado, que es cuando completa la meiosis y se forma los pronúcleos (Zárate, 2010).

Además de la maduración nuclear, también es importante que exista una maduración citoplasmática ya que prepara al ovocito para soportar la fertilización y aportar los nutrientes requeridos para el desarrollo embrionario temprano (Zárate, 2010).

Zárate (2010) manifiesta que de manera natural, la meiosis inicia en el ovario fetal, pero se detiene antes del nacimiento, en la profase (PI) de la primera división meiótica; los ovocitos pasan entonces a la etapa reticulada, que es un estado de reposo nuclear y que suele durar hasta que se ovula el primer ovocito en la pubertad. Los ovocitos en reposo o inmaduros tienen un gran núcleo denominado vesícula germinal. La meiosis avanza desde la etapa de vesícula germinal o PI hasta la metafase de la segunda división meiótica en la que se detiene una vez más, dando como resultado un primer cuerpo polar que es expulsado al espacio perivitelino. De la misma manera en la que madura el núcleo se debe llevar a cabo la maduración del citoplasma.

INTA (2010) sustenta que cuando los ovocitos son aspirados desde los folículos terciarios reanudan espontáneamente la meiosis y al ser cultivados *in vitro* continúan con los procesos de maduración. De este modo la composición de los medios y el ambiente controlado por estufas de cultivo, deben brindar un ambiente adecuado para que la maduración ocurra en 24 horas de un modo similar a lo que sucede *in vivo* durante más de dos ciclos estrales en el bovino.

Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios para lograr este ambiente, involucra el uso de medios de cultivo tales como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc), antioxidantes (glutación, cisteamina, cistina), factores de crecimiento y macromoléculas (suero, albumina), en una atmósfera de 5% CO₂ a 38,5°C y humedad a saturación (INTA, 2010).

2.3. MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

Los resultados inapropiados al tratamiento hormonal y la falla en la fertilización en hembras con un alto índice de respuesta en la ovulación, son las limitantes actuales en la producción in vivo de distintas especies domesticas tales como: bovinos, porcinos, ovinos, equinos, entre otras.

Con los antecedentes anteriores la maduración *in vitro* es una técnica que está tomando auge en la actualidad para la producción, debido a que se han obtenido resultados satisfactorios y se han cubierto las necesidades y problemas existes en cuanto a la producción pecuaria se refiere.

Wani (2002) sustenta que se ha probado que la maduración *in vitro* de ovocitos es una técnica invaluable para la producción de un mayor número de embriones provenientes de animales de alto valor genético a un costo menor que con el empleo de las prácticas convencionales de superovulación y producción de embriones (Vol. 44, pp. 89- 95)

Gutiérrez (2006) señala que la maduración *in vitro* es un proceso complejo que consiste en cultivar y madurar los ovocitos recolectados en estado de vesícula germinativa (VG). Esta biotecnología reproductiva permite obtener, potencialmente, gametos para lograr posteriormente fecundar *in vitro*, muchos de los cuales difícilmente serían liberados del ovario de forma natural. La maduración en cultivo constituye, además, una herramienta fundamental en el estudio de la fisiología de los ovocitos y de los distintos factores que participan en el control y desarrollo de la meiosis.

Para efectuar la maduración *in vitro* de los ovocitos, es necesario la ejecución de los siguientes pasos: Recolección de los ovarios en el matadero, obtención de ovocitos, selección de los ovocitos y maduración in vitro de los ovocitos.

2.3.1. Recolección de ovarios en matadero.

Madison et al., (1992) sustenta que la recuperación de ovarios en el matadero se realiza mediante la intervención del recolector en el inicio de la cadena de matanza. Los ovarios se obtienen de vacas o novillas en diferentes estados fisiológicos dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio de los animales (Vol. 27, pp. 1-11).

Los ovarios recogidos son colocados en un termo de transporte que contiene solución salina (0.9% NaCL), o solución fosfato-tamponada salina (PBS). Estas soluciones contienen generalmente, como antibióticos 25 mg/l de kanamicina, o 100 UI/l de penicilina y 100 mg/l de gentamicina; los ovarios recolectados pueden ser llevados al laboratorio a partir de los 30 minutos hasta las 6 horas, así lo menciona (Madison et al., 1992, Vol. 27, pp. 1-11).

Para el mantenimiento de los ovarios durante la recolección en el matadero y el transporte al laboratorio, First & Parrish (1988) exponen que una temperatura a 30°C es importante ya que por debajo de esta, se ve comprometida la capacidad de maduración del ovocito in vitro (Vol. 5, pp. 160-168).

Una vez en el laboratorio, los ovarios son lavados repetidas veces en la solución de transporte. Seguidamente, los ovocitos pueden ser recogidos inmediatamente, o bien, los ovarios son colocados y mantenidos en baño termostático a 30°C antes de proceder a la obtención de los ovocitos (Fry et al., 1997, Vol. 47, pp. 977-987).

Blondin et al., (1997) indica que el tiempo que media entre la obtención de los ovarios, el transporte al laboratorio a 30°C y la obtención de los ovocitos puede variar entre 2 y 7 horas. De este modo, el tiempo en que los ovocitos son aspirados, tiene efectos positivos en la maduración in vitro de los ovocitos bovinos. Así ha podido establecerse, que la utilización de 4 horas de intervalo es considerada óptima para alcanzar elevados índices de maduración in vitro (Vol. 47, pp. 1061-1075).

2.3.2. Métodos de obtención de los oocitos.

Para la obtención de los ovocitos, se han descrito dos métodos: el método de aspiración y el método de disección.

2.3.2.1. Método de aspiración.

2.3.2.1.1. Punción post-mortem del ovario con una jeringa.

Esta práctica se efectúa a partir de hembras sacrificadas en el matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm (Herradón et al., 2007).

La técnica consiste en la succión de los folículos situados en la superficie del ovario por medio de una aguja. El diámetro de la aguja utilizada es considerado importante a efectos de no dañar los ovocitos recogidos. La aspiración de los ovocitos, se realiza mediante la succión de los folículos con agujas hipodérmicas estériles de 18 – 22 g unidas a jeringas estériles de 3 - 20 ml, posteriormente el líquido folicular es depositado en placas de Petri para buscar los ovocitos aspirados (Bols et al., 1996, Vol. 46, pp. 1001-1014).

Bols et al., (1997) indican que el tipo de bisel que tienen las agujas (corto o largo), también es importante en la eficiencia del método de recolección. Aquellas agujas que tienen bisel largo son más eficientes en la recolección que las agujas de bisel corto (Vol. 47, pp. 1221-1236).

2.3.2.1.2. Punción in vivo del ovario con aguja.

Se lo realiza a partir de animales vivos utilizando la aspiración transvaginal ecoguiada (OPU). Esta técnica permite recoger ovocitos en las hembras de más de seis meses de edad, durante los primeros tres 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 seis meses de edad) es necesario recurrir a la laparoscopia (Herradón et al., 2007).

Hincapié (2010) sustenta que la recolección de ovocitos de animales vivos permite incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora al año, obtenidos por procedimientos *in vitro*, además permite la disminución del intervalo generacional y ayuda a establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia productiva.

Además la OPU se puede aplicar durante los primeros tres meses de gestación a novillas o vacas y a novillonas pre púberes con lo que se logra hacer más corto el intervalo generacional. La OPU-FIV permite obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad o mala respuesta a los tratamientos superovulatorios. Se ha demostrado que al final del periodo de aspiraciones los animales pueden retornar a sus ciclos estrales normales y ser incorporados a sus programas de cría. La viabilidad de los embriones producidos a partir de los ovocitos obtenidos por aspiración es similar a la alcanzada por embriones producidos por otros procedimientos *in vitro*, pero un poco más baja que la obtenida para embriones obtenidos por lavado, obteniéndose porcentajes de preñez que varían desde un 25-45 % (Hincapié, 2010).

2.3.2.2. Método de disección.

El método de corte consiste en colocar los ovarios en placas de Petri con medio de recolección de ovarios y cortar la superficie y el interior con un bisturí, haciendo cortes de 2mm de separación (Seneda et al., 2001, Vol. 67, pp. 37-43.)

Hamano & Kuwayama (1993) sostienen que mediante el corte del ovario se obtienen ovocitos de mejor calidad para la fecundación *in vitro*, así como un mayor número, pero no todos alcanzan el tamaño adecuado para la maduración meiótica y desarrollo embrionario, ya que muchos son obtenidos de folículos de menor tamaño y no superficiales (Vol. 39, pp. 703-712)

Por otro lado las tasas en la disminución de recuperación y producción de embriones en el caso de la aspiración folicular pueden ser debido al efecto nocivo sobre el cumulus durante la aspiración (Arlotto et al., 1996, Vol. 45, pp. 943-956).

2.3.3. Selección y clasificación de los ovocitos.

Santa Cruz (2012) señala que la clasificación y selección de los ovocitos obtenidos en el laboratorio para ser madurados *in vitro* deben seguir parámetros visuales tales como: valoración morfológica, el aspecto que presenta su citoplasma, las células del cumulus que lo envuelven y el tamaño del ovocito; así como también métodos de selección basados en la morfología del ovario, el diámetro folicular, y el uso de una tinción vital (test azul de cresil brillante –BCB-) que evalúe el crecimiento del ovocito .

2.3.3.1. Selección de ovocitos.

2.3.3.1.1. Selección según la valoración morfológica de los ovocitos.

La morfología que presentan los ovocitos recogidos de los ovarios, nos brinda la posibilidad de predecir su capacidad de reiniciar la meiosis y de este modo seleccionar los gametos que garanticen un buen comportamiento en su maduración (Arlotto et al., 1996, Vol. 45, pp. 943-956).

La selección se efectúa siguiendo dos criterios:

- Aspecto citoplasmático del ovocito

Leibfried & First (1979) afirman que deben poseer un citoplasma granulado fino y uniforme, sin mostrar espacio perivitelino ni vacuolizaciones (Vol. 48, pp. 76-86).

- Aspecto y morfología del cumulo celular que le rodee.

Es decir el cumulo no debe encontrarse expandido ni disperso sino compacto y sin aglutinaciones (Leibfried & First, 1979, Vol. 48, pp. 76-86).

2.3.3.1.2. Selección según la morfología del ovario.

Gandolfi et al., (1997) clasifican a los ovarios en tres categorías de acuerdo a la cantidad y tamaño de los folículos. Así tenemos:

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

De los cuales las categorías 1 y 2 contienen ovocitos que forman mayor proporción de blastocistos, después de ser madurados y fertilizados *in vitro* (Vol. 48, pp. 1153-1160).

2.3.3.1.3. Selección según el diámetro folicular.

Los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de oocitos incompetentes o bien atrésicos (Motlik & Fulka, 1986, Vol. 25, pp. 87-96), mientras que los mayores de 10 mm presentan un mayor número de oocitos degenerados (Fukui & Sakuma, 1980, Vol. 22, pp. 669-673). Herradón et al., (2007) expone que los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm son los pertinentes para la maduración *in vitro*.

Esto lo corrobora Lonergan et al., (1992) indicando que los folículos, con un diámetro de entre 2 y 6 mm, permiten una tasa de recuperación de oocitos (número de oocitos obtenidos/número de folículos aspirados) aptos para el cultivo mayor que en los folículos de mayor tamaño (Vol. 37, p. 248).

Por otro lado Wurth & Kruip (1992) indican que los oocitos, procedentes de folículos ligeramente atrésicos, tienen una capacidad normal para madurar *in vitro*, siempre que el cúmulo y el citoplasma no presenten signos claros de degeneración (Vol.1, pp. 387-389).

2.3.3.1.4. Selección según el test azul cresil brillante (BCB).

La tinción del complejo cumulus ovocito (COCs) de bovinos con azul de cresil brillante antes de la maduración *in vitro* (MIV) podría ser usada para incrementar el número de ovocitos competentes desde el punto de vista del desarrollo. La tinción con azul de cresil brillante determina la actividad intracelular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que se sabe que juega un papel crítico en el crecimiento celular (Santa Cruz, 2012).

2.3.3.2. Clasificación de los ovocitos.

Esquema de clasificación de acuerdo a la apariencia de las células del cumulus y del citoplasma:

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

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

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

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

- Categoría 4.- Ovocitos desnudos.

b) De acuerdo a la apariencia del citoplasma, los ovocitos se pueden clasificar en tres categorías:

- Categoría 1.- Presentan citoplasma granulado, homogéneo y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

- Categoría 2.- Presenta citoplasma granulado no homogéneo, (periferia clara y centro oscuro) y que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

- Categoría 3.- Presentan citoplasma vacuolado, fragmentado y que no llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida (Leibfried & First, 1979, Vol. 48, pp. 76-86).

Leibfried & First (1979) sustentan que aquellos ovocitos que con tres o más capas compactas de células del cumulus que lo rodeen y citoplasmas homogéneos, se clasifican como aptos y se seleccionan para maduración *in vitro*. Por el contrario, aquellos que se presentan rodeados por menos de tres estratos de células del cumulus; cumulus no compacto y citoplasmas heterogéneos o picnóticos se clasifican como no aptos y son descartados para maduración *in vitro* (Vol. 48, pp. 76-86).

2.4. TIEMPO DE CULTIVO Y TEMPERATURA EN LA MADURACIÓN OVOCITARIA.

El tiempo de incubación como también la temperatura, son parámetros importantes a considerar en los protocolos de maduración ovocitaria. La temperatura utilizada más comúnmente en los cultivos de células mamíferas es 37°C. En los cultivos de gametos bovinos, en cambio, se ha utilizado rutinariamente 39°C, por ser ésta la temperatura corporal de la especie y por haber probado mejorar significativamente los porcentajes de fecundación *in vitro*, en comparación a otras temperaturas (Lenz et al., 1983, Vol. 29, pp. 173-179).

No obstante, para la maduración nuclear al menos, no habría diferencias importantes en los cultivos a 39°C y 37°C, ya que los ovocitos reinician la meiosis alcanzando la metafase dos, cuando son madurados a 37°C o 39°C (Leibfried et al., 1986, Vol. 35, pp. 850-857).

Por otro lado Lim et al., (1992) exponen que la duración óptima del tiempo de maduración se ha estandarizado a un período de 22-26 horas debido a que en ese lapso se lograría completar satisfactoriamente la maduración hasta metafase dos -Cuadro 2- (Vol. 37, pp. 351-361).

Por otra parte, ovocitos cultivados por 44 a 48 horas para maduración aún podrían mantener su capacidad de transformar el núcleo espermático en pronúcleo, pero disminuiría su capacidad de segmentación posterior (Chian et al., 1992, Vol. 37, pp. 665-672).

Cuadro 1. Cambio del estado nuclear de ovocitos bovinos durante 24 horas de maduración in vitro.

Horas (a)	Número de ovocitos	N° (%)					
		GV	GVBD	MI	AI	TI	Mil
0	31	29(93,5)	2(6,5)				
3	30	22(73,3)	8(26,7)				
6	33	11(33,3)	19(57,6)	3(9,1)			
9	37	1(2,7)	25(67,6)	11(29,7)			
12	34	2(5,9)	17(50,0)	14(41,2)	1(2,9)		
15	31		4(12,9)	12(38,7)	6(19,4)	9(29,0)	
18	26		1(3,8)	9(34,6)	5(19,2)	10(38,6)	1(3,8)
21	27		3(11,1)		3(11,1)	3(11,1)	18(66,7)
24	26		2(7,7)				24(92,3)

a: Tiempo de fijación después del inicio del cultivo para maduración.

GV: Vesícula germinal; GVBD: Vesícula germinal fracturada; MI: Metafase I; AI: Anafase I;

TI: Telofase I; Mil: Metafase II.

Fuente: (Lim et al., 1992)

2.5. MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

Los embriones bovinos producidos *in vitro* son capaces de alcanzar la etapa de blastocisto mediante la utilización de varias formulaciones de medios de maduración y para ello un gran número de formulaciones de medios, bajo diferentes condiciones y protocolos, se utiliza en la actualidad (Voelkel & Hu, 1992, Vol. 37, pp. 1117-1131; Shamsuddin et al., 1993, Vol. 28, pp. 209-210; Abe & Hoshi, 2003, Vol. 49, pp. 193-202).

2.5.1. Medio de cultivo tisular 199 (TCM 199).

Thompson et al., (1998) sustentan que es el medio considerado estándar para la maduración *in vitro* de ovocitos; el TCM 199 se lo utiliza en la mayoría de los laboratorios con o sin suplementación de suero (Vol. 49, pp. 1239-49).

Lonergan et al., (1994) sostiene que el TCM suplementado con factores o hormonas aumentan la maduración citoplasmática en comparación con otros medios de cultivo, y por ser un medio muy complejo no es posible relacionar específicamente los componentes que son responsables por los diferentes resultados (Vol. 34, pp. 329-39).

Gandhi et al., (2000) expone que el medio de TCM presenta algún efecto en la maduración que resulta en una mayor división celular y consecuentemente en un mejor desarrollo embrionario comparado con otros medios. Pero la relación entre el número total de células y la viabilidad embrionaria aún no está determinada (Vol. 15, pp. 395-401).

Freitas, 2004 certifica el éxito en el desarrollo de embriones bovinos hasta la etapa de blastocisto, utilizando el medio TCM 199 como base para la MIV.

2.5.2. Fluido sintético de oviducto SOF.

El medio conocido como fluido sintético de oviducto (SOF), es un medio simple cuya composición está basada en el análisis bioquímico del fluido de oviducto ovino, más el agregado de albúmina sérica bovina (BSA). Este medio se ha utilizado para cultivar embriones ovinos, bovinos y caprinos. La capacidad del SOF para promover el desarrollo embrionario mejora cuando el cultivo se efectúa en una atmósfera con baja tensión de oxígeno (5-7%). Se ha asociado al uso del SOF una menor viabilidad, número de células y calidad embrionaria si se compara con embriones *in vivo* (Walker et al., 1992, Vol. 37, pp. 111-126).

Ali & Sirard (2002) indican que el SOF solo puede promover la maduración ovocitaria pero suplementado con polyvinylpyrrolidone 40 (PVP-40) promueve a altas proporciones de mórulas y blastocistos (Vol. 66, pp. 901-905).

Freitas, 2004 menciona que el SOF no es un medio ideal para la MIV, sin embargo es un medio que fácilmente puede ser suplementado con diversas sustancias debido a su composición más simple ya que sus componentes son más específicos siendo más fácil para investigar su acción, al contrario del TCM, cuya composición es compleja.

2.5.3. Suplementación con Suero.

El suero añadido al medio de maduración *in vitro* a menudo permite una mejora en la calidad del ovocito, en la tasa de fertilización y en el desarrollo embrionario (Freitas, 2004).

La eficiencia en la función de las células del cumulus durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, se reportaron principalmente por la utilización de suero al medio de maduración. Su uso, sin embargo, oculta la comprensión auténtica de las funciones de las células del cumulus o de los componentes químicos añadidos durante el proceso de maduración (Zhang et al., 1995, Vol. 40, pp. 338-44; Geshi et al., 2000, Vol. 63, pp. 1730-4).

Freitas (2004) indica que la repetibilidad de los resultados, cuando se utiliza el suerofetal bovino (SFB), puede variar de acuerdo con la partida y, por tratarse de producto biológico, la contaminación por agentes microbianos debe ser siempre considerada. Además, el suero fetal es fuente de diversos factores conocidos / desconocidos, los cuales pueden influenciar benéfica y maleadamente la maduración de los ovocitos y posterior desarrollo embrionario.

2.6. COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Entre los componentes más importantes a tener en cuenta se encuentran los citados a continuación:

2.6.1. Parámetros biofísicos y elementos inorgánicos.

2.6.1.1. *Osmolaridad.*

Teniendo en cuenta los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/Kg. Sin embargo, existe evidencia que indica que valores de alrededor de 245 mOsm/Kg favorecerían el desarrollo embrionario (Duque et al., 2003, Vol. 43, pp. 487-496).

2.6.1.2. *pH.*

La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados in vitro desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7,2 y 7,6 (Mucci et al., 2005).

2.6.1.3. *CO₂ y O₂.*

Mucci et al., (2005) sustentan que la fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO₂ en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas.

2.6.1.4. *El fluido oviductal.*

El fluido oviductal bovino y ovino se caracteriza por bajos niveles de Na y altos niveles de K, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo, así como: magnesio, calcio, bicarbonato, sulfatos y fosfatos (Mucci et al., 2005).

2.6.1.5. *El agua.*

El agua es el componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario (Marquant- Leguienne & Humblot, 1998, Vol. 49, pp. 3-11).

Boone & Shapiro (1990) señalan que las fuentes de agua utilizadas han sido el agua de lluvia, la obtenida por sucesivas destilaciones, o actualmente la producida por sistemas de purificación que utilizan el principio de ósmosis reversa. En estos últimos equipos, el grado de pureza del agua puede ser controlado mediante la determinación de su resistencia al paso de la corriente eléctrica (cuanto mayor sea esta, mayor será su pureza). La mayor resistencia ofrecida es 18,3 megaohms-cm a 25°C (Vol. 33, pp. 23-50).

2.6.2. Componentes Orgánicos.

Mucci et al., (2005) expresan que en la actualidad, existe una gran cantidad de información, no siempre coincidente, referida al efecto de ciertas hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares, sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, dos componentes son constantes en las formulaciones finales de los medios de cultivo utilizados corrientemente en la producción in vitro de embriones. Estos son:

2.6.2.1. Fuentes de energía.

Se ha demostrado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo (Lane & Gardner, 2000, Vol. 62, pp. 16-22).

La falta de utilización de la glucosa durante los primeros estadios estaría dada por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa. Esta enzima acelera la glucólisis catalizando la formación de fructosa 1-6 bifosfato a partir de fructosa 6 fosfato, y se encuentra controlada alostéricamente por el cociente ATP-ADP, particularmente alto en este período (Gardner, 1998, Vol. 49, pp. 83-102)

En esta etapa, la adición de glucosa a los medios de cultivos no solamente no sería aprovechada, sino que, a su vez, generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario (Takahashi & First, 1992, Vol. 37, pp. 963-978).

Sin embargo, en embriones bovinos a partir del estadio de 8-16 células y en respuesta a una alta demanda de energía necesaria para la compactación, y la formación y expansión del blastocelo, el cociente ATP-ADP podría disminuir, y con ello, la inhibición ejercida sobre la enzima mencionada, con lo cual aumentaría el consumo de glucosa. Este metabolito también participa en la síntesis de precursores de ácidos nucleicos y de lípidos y su disponibilidad sería importante durante la eclosión fuera de la zona pelúcida (Menezo & Khatchadourian, 1991, Vol. 6, pp.136-143).

Con respecto a los lípidos, en los últimos años se ha debatido la posibilidad de mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados a través de la adición de ciertos componentes lipídicos a los medios de cultivo, específicamente ácido linoleico no como fuente energética,

sino como fluidificador de las membranas plasmáticas (Imai et al., 1997, Vol. 47, p. 347; Hochi et al., 1999, Vol. 52, pp. 497-504).

2.6.2.2. Fuentes de proteína.

2.6.2.2.1. Aminoácidos.

Estos elementos serían utilizados como fuente de energía, como buffer intracelular y para la síntesis de proteínas, siendo incorporados por transportadores de membrana específicos regulados en función del estadio de desarrollo o en respuesta a señales externas (Van Winkle, 2001, Vol. 64, pp. 1-12; Edwards et al., 1998, Vol. 13, pp. 3441-3448).

Se ha demostrado que los aminoácidos no esenciales favorecerían el desarrollo en estadios tempranos, mientras que los esenciales harían lo mismo en embriones de más de ocho células (Van Winkle, 2001, Vol. 64, pp. 1-12).

Este cambio en la utilización de aminoácidos, pareciera deberse a requerimientos específicos de las células embrionarias, en donde las células trofoblásticas, que dan origen a la placenta fetal, utilizarían aminoácidos no esenciales y glutamina, mientras que las de la masa celular interna, que originan al feto, tendrían preferencia por los esenciales (Gardner & Lane, 1998, Vol. 13, pp. 148-159).

2.6.2.2.2. Suplementación proteica

Wang et al., (1997) explican que usualmente se agrega suero bovino y/o albúmina sérica bovina (BSA) como fuente de proteínas a los medios de cultivo embrionario (Vol. 48, pp. 37-45).

El suero constituye la fracción líquida resultante del proceso de coagulación sanguínea, tanto in vivo como in vitro, y su calidad, en términos de composición química, depende usualmente

del tipo y estado del donante (suero fetal bovino (SFB), suero de ternero recién nacido, suero de novillo o vaca, suero de vaca en celo (SVC)), y de la partida o lote de formulación (Pinyopummintr & Bavister, 1994, Vol. 41, pp. 1241-1249).

La albúmina es una proteína plasmática de carácter ácido, soluble en agua, con un peso molecular aproximado de 69.000, y constituye uno de los componentes más importantes del suero sanguíneo. Debido a la presencia de grupos reactivos en su molécula, puede unirse a diferentes sustancias (ácidos grasos, hormonas, etc.) y transportarlas en sangre hasta sus órganos blanco. Junto con la inmunoglobulina G, son las proteínas más abundantes del fluido oviductal (Leese, 1988, Vol. 82, pp. 843-856).

Mucci et al., (2005) indica que algunos de los efectos benéficos que justifican la utilización del suero y la albúmina son:

- Proteger a los embriones en cultivo de sustancias tóxicas (ej. metales pesados).
- Aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas.
- Reducir la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental (placas de cultivo, pipetas, tubos, etc.)

Tanto el suero como la BSA tienen un rol similar como suplemento proteico. Sin embargo, la posible presencia de elementos no identificados ligados a ambos determina que algunos aspectos de su función no sean aun completamente comprendidos (Mucci et al., 2005).

2.7. SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*

El gran número de estudios sobre la maduración ha dado lugar a diversas metodologías y modificaciones de las técnicas de cultivo de los oocitos. Fundamentalmente, se tienen en cuenta: el soporte físico sobre el que se va a realizar la maduración (placa, tubo etc), el modo de

colocación del medio de cultivo, el número de oocitos por volumen de medio y si el cultivo se realiza de manera estática o con un ligero movimiento. (Lorenzo, 1992)

Sugie et al., (1980) citan dos grupos de sistemas de cultivo: un cultivo en el que no se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera, mediante el uso de un cierre hermético y un segundo tipo de cultivo que se realiza manteniendo un intercambio gaseoso continuo. El primero no tiene interés ya que no permite el intercambio gaseoso, necesario para la maduración de los oocitos, mientras que dentro del segundo grupo se pueden citar dos tipos: los sistemas abierto y cerrado.

El sistema abierto engloba aquellos recipientes en los que se coloca un volumen de medio de cultivo que está en contacto directo con la atmósfera que le rodea. El medio se coloca en placas Petri, cámaras de cultivo, placas ELISA o tubos de cristal. El inconveniente de este sistema es que presenta una gran superficie de evaporación, lo cual puede originar un aumento de la osmolaridad, al elevarse la concentración de sodio (Fukui & Sakuma, 1980, Vol. 22, pp. 669-673).

El sistema cerrado consiste en recubrir el medio de cultivo con aceites minerales, de tal manera que se impida la evaporación del medio pero se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera. El modo más corriente de efectuar este tipo de cultivo es el de las “microgotas”. Consiste en colocar un determinado número de gotas, habitualmente con un volumen de 50 a 100 μ l, en una placa Petri y recubrirlas, posteriormente, con aceite de parafina o silicona. El agua no se evapora fácilmente, pero alguno de los componentes del medio puede ser soluble en aceite; por ello, hay que equilibrarlo, antes de iniciar el periodo de cultivo. El sistema de microgotas permite una identificación individual de los oocitos, minimiza los riesgos de contaminación y facilita el cultivo independiente de los oocitos y una observación de los mismos más fácil que con otros sistemas (Brinster, 1970, Vol. 21, pp. 17-22).

2.8. REGULADORES DE LA MADURACIÓN *IN VITRO*

Los siguientes reguladores participan activamente en la maduración del oocito, tanto *in vivo* como *in vitro*:

2.8.1. 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. Cada una de ellas, individual o colectivamente, actúan para conseguir la correcta maduración del oocito. La suplementación del medio de maduración de oocitos bovinos, con gonadotropinas y esteroides, ha demostrado tener un efecto positivo en la maduración de los oocitos *in vitro* en todas las especies (First & Parrish, 1987, Vol. 34, pp. 151-165).

2.8.1.1. Gonadotropinas.

La adición de gonadotropinas aumenta las tasas de maduración en diversas especies animales: hámster, coneja, oveja, cerda y vaca. La hormona luteinizante (LH) ha demostrado tener efectos positivos en los sistemas de maduración *in vitro*. La LH mejora la maduración citoplasma del oocito, además la presencia de LH, en el medio de cultivo *in vitro*, provoca una mayor oxidación mitocondrial de la glucosa, en los oocitos bovinos, lo cual favorece la maduración de los mismos (Zuelke & Brackett, 1990, Vol. 43, pp. 784-787).

La hormona folículo estimulante (FSH) también ha demostrado inducir la maduración en oocitos de rata, coneja y vaca. Sin embargo, muchos autores indican que la FSH no es imprescindible para la maduración nuclear del oocito pero tiene influencia en la expansión del cúmulo celular. La combinación de FSH y LH también puede estimular la expansión del cúmulo celular y la maduración en oocitos bovinos. Sin embargo, la adición de una, otra o ambas gonadotropinas, a los medios, llevan a cabo un efecto distinto, dependiendo del estado de

maduración de las células del cúmulo, ya que, según este estado, las células presentan un número mayor o menor de receptores para la LH o para la FSH y, por lo tanto, responden de distinta manera según la hormona empleada en los medios (Armstrong et al., 1991, Vol. 626, pp. 137-158).

La gonadotropina coriónica humana (hCG) se ha utilizado en los medios de maduración en lugar de la LH, ya que presenta acciones similares a esta última (Xu et al., 1986, Vol. 27, pp. 505-519).

2.8.1.2. *Esteroides.*

Los esteroides más utilizados en los medios de maduración son el estradiol y la progesterona, describiéndose que la adición de ambos completa la maduración nuclear y citoplásmica. El estradiol por sí solo parece no afectar a la maduración nuclear del oocito, pero sí influye en la maduración citoplásmica y sobre todo en la fecundación. Por otro lado, la presencia de este esteroide, en el medio de maduración, se considera un factor importante para la formación del pronúcleo masculino, aunque en se ha comprobado que una suplementación exclusiva con estradiol, durante la maduración, puede provocar anomalías cromosómicas (Fukui et al., 1982, Vol. 18, pp. 161-175).

La progesterona demuestra tener un efecto estimulante en la maduración de oocitos de coneja, cuando se añade a los medios de cultivo. Sin embargo, sobre los oocitos bovinos no se describe ningún efecto positivo. Otros esteroides (testosterona, androstenodiona, entre otras) han sido poco estudiados y no han demostrado ningún efecto apreciable sobre la maduración *in vitro*, en las concentraciones y especies estudiadas (Fukushima & Fukui, 1985, Vol. 9, pp. 323-332).

2.8.1.3. Otras hormonas.

Además de las hormonas citadas anteriormente, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y sus agonistas han demostrado estimular la maduración de oocitos. Por otro lado, estudios recientes indican que la hormona estimulante del tiroides (TSH) puede influir en la posible regulación de la maduración, ya que su adición a medios de maduración *in vitro* aumenta la expansión del cúmulo y la tasa de maduración en oocitos bovinos (Younis et al., 1992, Vol. 31, pp. 144-151).

2.8.2. Sistema adenosín mono fosfato cíclico “AMPC”.

El sistema que regula los niveles de adenosín mono fosfato cíclico “AMPC”, en el interior del ovocito, es el encargado de mantener su núcleo en reposo meiótico “GV”. 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 AMPC intracelular, 2.) fosfodiesterasa “PDE” actúa disminuyéndola (Sirard et al., 1992, Vol. 37, pp. 39-57).

Sirard et al, (1992) citan que, 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 ovocito. Entre los primeros, el foskolín y entre los segundos, la isobutilxantina. 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”. 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” (Vol. 37, pp. 39-57).

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”. 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 (Sirard et al., 1992, Vol. 37, pp. 39-57).

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, también sustancias como el factor inhibitor de la maduración “OMI”, factor de células de la granulosa “GCF” o sustancia similar a la sustancia inhibitora de la maduración “MIS” (Downs et al., 1985, Vol. 1985, pp. 454-458).

2.9. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SUERO SOBRE LA CANTIDAD Y CALIDAD DE LOS EMBRIONES PRODUCIDOS IN VITRO

Se ha observado que la adición de suero a los medios de cultivo tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadios y estimulando el desarrollo de mórulas y blastocistos (Pinyopummintr & Bavister, 1994, Vol. 41, pp. 1241-1249).

Cuadro 2. Análisis bioquímico del suero de novillo y fetal bovino de dos lotes distintos (CanSera International Inc. y Bocknek Lab).

Determinación	Valores encontrados			
	Suero de novillo		Suero fetal bovino	
	CanSera Int.	Bocknek Lab.	CanSera Int.	Bocknek Lab.
Albúmina g/l	36	34	19	19
Globulinas g/l	36	37	19	19

Urea mm	3,6	2,9	6,3	6,3
Glucosa mm	1,3	0,8	7	7
Potasio mm	6,3	5	3,44	13,6
Sodio mm	140	140	135	135
Fósforo mm	1,87	2,24	3,44	3,44
Calcio mm	2,45	2,45	3,72	3,72

Fuente: Adaptado de (Palasz, 1996; Tornesi & Archer, 1993)

El suero es considerado un compuesto variable e indefinido, lo cual genera variaciones en la composición de los medios utilizados e interfiere con la repetibilidad de los resultados obtenidos (Gardner & Lane, 1998, Vol. 13, pp. 148-159).

Rorie et al., (1994) observaron que el suero producía un efecto positivo sobre la tasa de producción de embriones sólo si el cultivo se efectuaba en cocultivo con células somáticas. Teniendo en cuenta el impacto positivo del suero sobre el cultivo de células somáticas, puede suponerse que el efecto benéfico de esta suplementación se ve potenciado a través de su acción sobre las células del cocultivo (Vol. 42, pp. 385-395).

Rieger et al., (1992) por su parte exponen que el suero más utilizado es el SFB. Si bien es difícil concluir acerca de cuáles son los constituyentes del suero que presentan actividad embriotrófica, las diferencias mostradas en el cuadro 1 entre dos tipos de suero, en términos de composición química, pueden determinar una fuente de variación capaz de tener un impacto significativo en la producción in vitro de embriones. Puede observarse que la concentración de glucosa es 6 veces superior en el suero fetal respecto al del bovino adulto. Teniendo en cuenta que la utilización de este elemento aumenta notablemente luego de los primeros 3-4 ciclos de

división celular embrionaria, estas diferencias podrían contribuir a las variaciones observadas entre los ensayos. Con respecto a las proteínas, puede observarse también que sus concentraciones son superiores en un 85% en el caso del suero adulto respecto del fetal, y aunque poco se conoce acerca de la función de proteínas no específicas en el desarrollo embrionario, su metabolismo podría producir amoníaco, el cual, dependiendo de su concentración y del estadio embrionario que afecte, puede generar diferencias en cuanto a la producción total de embriones. En ambos tipos de suero, la relación proteína/glucosa es distinta y notablemente superior para el caso del bovino adulto, aunque no se dispone de información acerca de su posible impacto sobre el desarrollo embrionario (Vol. 95, pp. 585-595).

Las variaciones en la concentración de factores embriotróficos como son: el factor transformante de crecimiento α (TGF, transforming growth factor) y el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1, insulin-like growth factor) reducen la incidencia de apoptosis y aumentan el número de células embrionarias, mientras que el factor de necrosis tumoral α (TNF, tumor necrosis factor) induce apoptosis y fragmentación de ácidos nucleicos (Brison & Shultz, 1997, Vol. 56, pp. 1088-1096; Makarevich & Markkula, 2002, Vol. 66, pp. 386-392; Betts & King, 2001, Vol. 55, pp. 171-191).

Byrne et al., (1999) señalan que la utilización de suero en los medios de cultivo podría introducir cantidades variables de estos factores con efectos positivos y negativos sobre el desarrollo embrionario y esto podría depender de la partida, tipo de donante y del procedimiento de preparación, entre otros (Vol. 117, pp. 97-105).

2.9.1. Efectos negativos del suero.

Algunos efectos negativos que han sido atribuidos al uso de suero en los medios de cultivo son:

- Alteraciones mitocondriales (Farin et al., 2001, Vol. 55, pp. 151-170).
- Excesiva producción de lactato, presencia de células oscuras y granuladas en la masa celular interna (Krisher et al., 1999, Vol. 60, pp. 1345-1352).
- Aumento de células apoptóticas (Byrne et al., 1999, Vol. 117, pp. 97-105).
- Menor síntesis proteica (Kuran et al., 2001, Vol. 55, pp. 593-606).
- Disminución de la relación células de la masa celular interna: células trofoblásticas y del número de complejos de unión entre las células embrionarias (Fouladi-Nashta et al., 2005, Vol. 10, pp. 497-502).
- Se observaron alteraciones durante la preñez en hembras gestantes de embriones producidos con suero, tales como alargamiento del período de gestación (Thompson et al., 1995, Vol. 53, pp. 1385-1391).
- Nacimiento de crías con peso superior a lo normal -large offspring syndrome- (Farin et al., 2001, Vol. 55, pp. 151-170).

2.9.2. Consideraciones en los medios de cultivo: con y sin utilización de suero.

Los embriones cultivados en presencia de suero presentan una morfología diferente comparada con los producidos sin suero (Shamsuddin & Rodríguez-Martínez, 1994, Vol. 41, pp. 307-316).

La suplementación con suero se encuentra asociada a un menor grado de compactación de las mórulas, y que tanto éstas como los blastocistos adquieren características similares a los obtenidos in vivo cuando son producidos en medios sin suero (Thompson, 1997, Vol. 9, pp. 341-354; Crosier et al., 2001, Vol. 64, pp. 1375-1385).

Boni et al., (1999) postularon que variaciones en la expresión de ARNm para la Connexina 43 (Cx43), una proteína que participa en la formación de las uniones de tipo gap en las células

de los embriones en estadios de preimplantación, podría explicar algunas de las diferencias encontradas entre los embriones producidos *in vitro* y los obtenidos *in vivo* o, incluso, producidos en diferentes medios de cultivo incluyendo la presencia o ausencia de suero en los mismos (Vol. 61, pp. 1050-1055).

Los embriones producidos *in vitro* en cultivos suplementados con suero presentaron alteraciones en la expresión de genes que desempeñan un rol de particular importancia durante el desarrollo embrionario temprano. Una de estas fue precisamente la disminución de la transcripción del gen que codifica para Cx43, comparada con los embriones cultivados en un medio libre de suero (Lazzari et al., 2002, Vol. 67, pp. 767-775; Rizos et al., 2003, Vol. 68, pp. 236-243)

2.9.3. Efecto del suero sobre la viabilidad de los embriones criopreservados.

La suplementación de los medios de cultivo con suero se ha relacionado con la acumulación anormal de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Shamsuddin & Rodríguez-Martínez, 1994, Vol. 41, pp. 307-316; Dorland et al., 1994, Vol. 13, p. 70; Thompson et al., 1995, Vol. 53, pp. 1385-1391; Abe et al., 1999, Vol. 53, pp. 325-335).

Abe et al., (2002) mencionan que la presencia de las estructuras nombradas anteriormente en los embriones bovinos producidos *in vitro* se ha asociado a su alta sensibilidad a los procesos de criopreservación en general, y en los desarrollados en medios de cultivo suplementados con suero en particular (Vol. 61, pp. 57-66).

El origen de la acumulación de gotas lipídicas intracitoplasmáticas en los embriones producidos *in vitro*, cultivados en medios suplementados con suero, actualmente es desconocido, aunque existen dos teorías que podrían explicarlo:

- La presencia de suero genera un efecto deletéreo sobre la estructura mitocondrial, lo cual, al producir alteraciones morfológicas y funcionales en esta organela provocaría una acumulación anormal de gotas lipídicas producto de alteraciones en su metabolismo (Dorland et al., 1994, Vol. 13, p. 70)

- Teniendo en cuenta la capacidad de captación de ácidos grasos, fosfolípidos y triglicéridos por parte de las células somáticas en cultivo, podría inferirse que la acumulación de lípidos intracitoplásmicos por parte de los blastómeros se debería a la incorporación de lipoproteínas presentes en el suero adicionado a los medios de cultivo (Thompson et al., 1995, Vol. 53, pp. 1385-1391; Abe et al., 1999, Vol. 53, pp. 325-335).

Con estos antecedentes en la actualidad existen en el mercado una variedad de compuestos formulados con el fin de reemplazar el suero en los medios de cultivo de distintas líneas de células somáticas, lo que ha generado que se realicen distintas investigaciones con múltiples resultados y que a su vez han logrado expandir la tecnología de producción de embriones *in vitro* a grandes escalas científicas, en cuanto a medicina veterinaria se refiere.

2.10. PROCEDIMIENTO PARA LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS

2.10.1. Maduración.

La obtención de los ovarios se lo realiza en un matadero local, se deben mantener los ovarios calientes colocándolos en un termo. También pueden mantenerse en una solución salina cálida al 0.9%. (0,9% de solución salina = 9 g / L de NaCl / agua destilada). La adición de 100 UI de penicilina / ml y 100 µg de estreptomicina / ml a la solución salina para controlar la contaminación bacteriana es opcional. Los oocitos son viables en los ovarios durante 6 a 8 horas después del sacrificio. El almacenamiento de más de 8 horas requiere almacenamiento a temperatura más baja, es decir, de 15 a 20°C (Duran & Monson, 2013).

2.10.2. Mañana de colección de oocitos.

2.10.2.1. Preparación de los medios apropiados:

- Medio de lavado TL Hepes.

- Medio de maduración.

Figura 5. Preparación de medios.



Fuente: (Duran & Monson, 2013).

2.10.2.2. Preparación de los platos de maduración:

Duran & Monson (2013) lo detallan de la siguiente manera:

1. En una campana de flujo laminar, rocíe, limpie y seque con aire las superficies con 70% de EtOH; esto se obtiene con 70 ml de etanol (alcohol etílico) + 30 ml de agua destilada = 100 ml de 70% de EtOH.

2. Pipetee entre diez y dieciocho gotas de medio de maduración 50 μ l, por placa petri estéril de 65 mm. Use la técnica de banco estéril en todo momento.

3. Utilizando una pipeta estéril de 10 ml y un bulbo de goma, la superposición cae con 8,5-10 ml de aceite de parafina (mineral), lo suficiente para cubrir completamente las gotas. El sobrellenado hace que la tapa se selle en la placa y evita el equilibrio.

4. Permita que las placas se equilibren en la incubadora de CO₂ durante al menos dos horas. La incubadora debe mantenerse a 95% de humedad, 39 ° C y 5% de CO₂.

2.10.3. Colección de oocitos.

2.10.3.1. Preparación del área de aspiración:

1. Desinfecte el área de recolección. Humedezca con 70% de EtOH y deje secar al aire. Asegúrese de que todas las superficies y utensilios sean estériles.

2. Coloque el material absorbente sobre el área desinfectada para ayudar a contener el desperdicio de fluido.

3. Coloque el receptáculo de ovario (un cubo limpio de 2 cuartos) en el medio del área cubierta.

4. Enjuague el cabezal de aspiración y las líneas de vacío con 70% de EtOH y seque al aire.

5. Monte la cabeza esterilizada, el tubo de centrífuga de 50 ml y la aguja estéril de calibre 18 de 1-1.5 pulgadas.

6. Tenga una bolsa de plástico disponible para descartar ovarios y escombros.

Si el aparato de aspiración no está disponible, una simple jeringa estéril de 10 ml y una aguja de calibre 18 de 1-1.5 pulgadas será suficiente. aspire el líquido de los folículos y colóquelo en un tubo estéril de 50 ml (Duran & Monson, 2013).

2.10.3.2. Prepare los ovarios para la aspiración:

1. Al llegar al laboratorio, registre la temperatura en el termo (óptimo 28-32°C).

2. Volcar los ovarios en la cesta de malla de alambre (si está disponible). Enjuague los ovarios suavemente en solución salina tibia o agua cerca de la misma temperatura que el termo (30°C) para eliminar el exceso de sangre, líquido y tejido.

3. Coloque los ovarios drenados en el receptáculo previamente dispuesto en el centro del área desinfectada y cubierta (Duran & Monson, 2013).

Figura 6. Aspiración de ovocitos



Fuente: (Duran & Monson, 2013).

2.10.3.3. Aspirar folículos:

1. Encienda la bomba de aspiración (si se usa) y revise el manómetro (5-7 libras por pulgada cuadrada “psi”). Si va a usar aspiración con jeringa, monte la jeringa con la aguja.

2. Aspirar folículos pequeños (2-8 mm). Los folículos más grandes contienen ovocitos indeseables. Si lo desea, use guantes de látex.

3. Mantenga el bisel de la aguja hacia arriba, rozando directamente debajo de la superficie del ovario, aspirando el líquido y el ovocito. O bien, aspirar cada folículo individualmente o "enhebrar" la aguja a través del ovario, folículo a folículo.

4. El líquido debe ser de color amarillento, por lo tanto, evite folículos con sangre oscura.

5. Después de aspirar todos los ovarios, permita que el tubo se asiente durante 10 a 15 minutos para permitir que los ovocitos y otras células se asienten en la parte inferior, formando un gránulo o "tapón" por gravedad.

A partir de aquí todos los procedimientos deben ser hecho en una habitación caliente a una temperatura de 28-36°C (Duran & Monson, 2013).

2.10.4. Recuperación de oocitos.

2.10.4.1. Preparación del área de recolección:

1. Desinfecte el área de trabajo con 70% de EtOH.

2. Reunir:

- Medio de lavado TL Hepes hecho previamente. Debe estar caliente (30-35°C).

- Tubo de centrifuga de 50 ml, para el almacenamiento de aspirados

- Filtro estéril de ovocitos (colador de células de nailon de 100 μ m) –opcional

- Jeringa de 10-12 ml y aguja de 1,5 pulgadas para la aspiración de ovocitos en el folículo

ovárico.

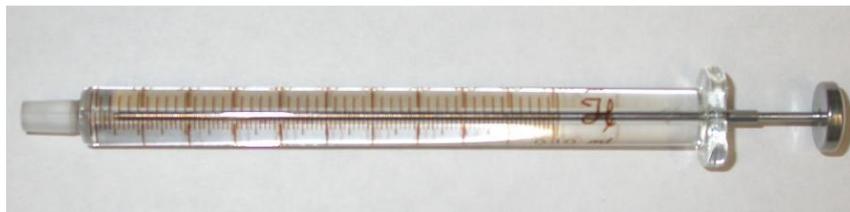
- 1 placa de Petri grande (100 mm), para buscar ovocitos

- 2 placas Petri medianas de (65 mm) para el lavado de ovocitos

- 1 pipeta Pasteur de vidrio estéril largo y bulbo de goma, para extraer ovocitos de un tubo de centrifuga de 50 ml y colocarlos en el plato de búsqueda.

- Jeringa Hamilton de 20 μ l adjunta con una pequeña punta estéril (u otro dispositivo adecuado para recoger ovocitos).

Figura 7. Jeringa Hamilton.



Fuente: (Duran & Monson, 2013).

Figura 8. Punta pequeña estéril



Fuente: (Duran & Monson, 2013).

3. Marque una cuadrícula (dibuje o raya líneas) en la parte inferior externa del plato grande y una de las fuentes medianas para facilitar la búsqueda.

4. Llene las placas de Petri de tamaño medio hasta la mitad con medio de lavado TL Hapes y colóquelas en el calentador de portaobjetos (30-35 °C). Manténgase en el lado frío para evitar el choque térmico a los ovocitos.

5. Destape el tubo de centrifuga de 50 ml, colóquelo en posición vertical en una gradilla de tubos y coloque el filtro (si se usa) dentro de la abertura (Duran & Monson, 2013)

2.10.4.2. Filtrar fluido folicular.

1. Retire el pellet de ovocitos del tubo de recolección con una pipeta Pasteur, girando suavemente mientras estira la pellet.

2. Eche a chorros el contenido de la pipeta en el filtro en el tubo de centrífuga (o directamente en la placa de Petri grande) y deje que el líquido drene. Puede ayudar a levantar y bajar el filtro como una aspiradora para pasar el líquido. Los oocitos permanecerán en el filtro.

Figura 9. Filtrado folicular



Fuente: (Duran & Monson, 2013)

3. Repita las instrucciones anteriores aproximadamente 3-4 veces o hasta que se eliminen todos los restos del tubo de recolección (Duran & Monson, 2013).

2.10.4.3. Coloque el contenido del filtro en una placa Petri grande:

1. Coloque una pipeta Pasteur llena (~ 2 ml) de líquido folicular (proteína) en el fondo de la placa de Petri ranurada. Esto evita que los ovocitos se peguen.

2. Vierta un poco de Hepes TL en un segundo frasco estéril con tapa de tapón de tabique o placa de petri para evitar contaminar la botella original de medio de lavado TL Hepes. De este recipiente o plato, llene la jeringa de 10-12 ml.

3. Invierta el filtro sobre una placa Petri grande y enjuague bien todos los lados del filtro con TL Hepes incluido en la jeringa. Los ovocitos y las células caerán en el plato con el líquido folicular.

4. Repita el enjuague varias veces hasta que ya no pueda ver suciedad en el filtro.

5. Si es necesario, agregue TL Hepes para completar el llenado del plato de búsqueda (Duran & Monson, 2013).

2.10.4.4. Recuperar ovocitos:

1. Extienda el contenido del plato de búsqueda uniformemente en la parte inferior de la placa con una punta pequeña limpia de 20 μ l unida a la jeringa Hamilton (u otro dispositivo).

2. Use la Hamilton y la punta para recolectar solo aquellos ovocitos con buen cúmulo intacto, independientemente de la apariencia del citoplasma. Evite los ovocitos desnudos (sin cúmulos) y atrésicos (de aspecto velludo).

3. Coloque los ovocitos recogidos en la placa Petri de tamaño medio anotada antes de que el nivel del TL Hepes atraído hacia la punta pequeña, hasta que llegue a ser lo suficientemente alto como para entrar en el cubo de plástico de la misma. Registrar el plato ayuda a facilitar la búsqueda y sirve como referencia de dónde se encuentra en el plato (Duran & Monson, 2013).

2.10.4.5. Lavar ovocitos:

1. Mueva los ovocitos recogidos de la placa Petri de tamaño medio marcada en el plato medio restante con un mínimo arrastre de medios y células en exceso.

2. Repita este proceso hasta que desaparezcan la mayoría o la totalidad de los restos, dejando solo los ovocitos deseados (Duran & Monson, 2013).

Figura 10. Lavado de oocitos



Fuente: (Duran & Monson, 2013).

2.10.4.6. Colocación de los ovocitos en gotas:

1. Obtenga placas de maduración equilibradas de la incubadora. Las gotas deben ser de un color rosa carnososo. Mantenga un medio de maduración extra en la incubadora como control y en caso de que una placa esté dañada.

2. Usando Hamilton y la punta, mueva 10 ovocitos a cada gota de 50 μ l en el plato. Minimice el arrastre del medio de lavado.

3. Asegúrese de contar los ovocitos con cuidado y minimizar el tiempo que las placas están fuera de la incubadora para que no se produzca un desplazamiento del pH en el medio de maduración.

4. Coloque con cuidado las placas de maduración en la incubadora. No dejes que las gotas se junten. Espere unos 20 a 24 horas a 39 ° C para que ocurra la maduración. Las células del cumulus se expandirán para permitir la fertilización.

5. Deseche las placas de búsqueda y los medios usados, tubos, etc.

Mantenga sobrantes TL Hepes en el refrigerador durante la noche. Se puede filtrar y reutilizar al día siguiente; reutilizar solo un día.

III. RESUMEN DEL ESTADO DE ARTE DEL ESTUDIO DEL PROBLEMA

La utilización de diferentes medios para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos es una de las técnicas de mayor interés, dentro de la biotecnología de la reproducción; ya que esta tecnología tiene propiedades como menores costos para obtener embriones; así como evitar la pérdida de animales con un alto valor genético y las generaciones de animales sanos libres de enfermedades.

3.1. MADURACIÓN IN VIVO DE OVARIOS

Los ovarios de los mamíferos contienen folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo, de los cuáles solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos, con el fin de aprovechar el máximo potencial genético de una donadora por procedimiento *in vitro* (INTA, 2010).

3.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE OVARIOS

Comúnmente se lo realiza en mataderos o camales, debido a su variabilidad de individuos y de muestras ya que se encuentran en diferentes estados de desarrollo.

Usualmente las formas de extracción de complejos cúmulo-ovocitos (COCs) de los folículos que se emplean son por punción o aspiración con jeringa, corte de folículos y perfusión de oviducto Zárate (2010).

El tipo de extracción dependerá mucho de la clase de estudio que se esté realizando, así como de su material y equipos disponibles para dicha investigación.

Los métodos usados para la colección y la maduración de los ovocitos afectan la inducción de la meiosis, así como el potencial de desarrollo de los ovocitos.

3.3. MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS

La maduración *in vitro* es un proceso complejo que consiste en cultivar y madurar los ovocitos recolectados en estado de vesícula germinativa (Gutiérrez, 2006).

Los criterios que aseguran que ha ocurrido la maduración *in vitro* pueden resumirse en:

- 1.- Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estado de metafase II.
- 2.- Expansión y mucificación del cúmulo celular.
- 3.- Traslado de los gránulos corticales a la periferia del oocito.
- 4.- Desaparición de las uniones intercelulares (Flores, 2012).

3.4. MEDIOS DE MADURACIÓN

La maduración del ovocito compromete dos procesos: primero la maduración nuclear, que involucra la condensación del material nuclear seguido de la forma de los cromosomas por dos ciclos meióticos y segundo la maduración del citoplasma que compromete la redistribución de los organelos y la maduración (Abe & Hoshi, 2003, Vol. 49, pp. 193-202).

En la maduración de ovocitos se han utilizado diversos tratamientos, entre ellos se encuentran el medio TCM199, Suero Fetal Bovino - Fetal Calf Serum (SFB - FCS), Suero de buey (SB), Suero de vaca en celo (SVC), Células de la granulosa, Piruvato, Glutamina, HEPES, Bicarbonato, Penicilina, Estreptomina, Gentamicina, Estradiol (E2), LH y FSH (Pinyopummintr & Bavister, 1994, Vol. 41, pp. 1241-1249).

Cada uno de estos tratamientos cuenta con diversas propiedades, el presente estudio probó medios de maduración con suero de vaca en celo frente al suero fetal bovino ambos en las mismas condiciones de estudio.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

Cuadro 3. Materiales de oficina

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Laptop	1	Unidad
Cámara digital	1	Unidad
Lápiz	1	Unidad
Bolígrafo	1	Unidad
Resma de papel Bond (A4)	1	Unidad
Marcador	2	Unidad
Carpeta	1	Unidad
Impresora	1	Unidad

Cuadro 4. Materiales de campo

DESCRIPCIÓN MATERIALES FÍSICOS	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Mandil	1	Unidad
Guantes	1	Caja
Gorros	1	Caja
Mascarillas	1	Caja
Protector de zapatos	1	Caja
Microscopio	1	Unidad
Cooler	1	Unidad
Jeringas 5ml	1	Caja
Jeringas 10 ml	1	Caja
Agujas hipodérmicas 18'G	1	Caja
Bomba de vacío	1	Unidad
Pipetas	1	Caja
Cajas petri	1	Docena
Vaso de precipitación	1	Unidad
Pinza anatómica	1	Unidad

DESCRIPCIÓN MATERIALES FÍSICOS	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Estufa	1	Unidad
Filtros 0,22 micras	1	Caja
Filtros 0,45 micras	1	Caja
Campana de flujo Laminar	1	Unidad
DESCRIPCIÓN MATERIALES QUÍMICOS	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Solución Salina	1	Litro
Desinfectante	1/2	Litro
Alcohol	1	Litro
TL-HEPES	1	Litro
Stock de piruvato de sodio	1	Litro
Sulfato de Gentamicina	1	Litro
Buffer Fosfato Salino	1	Litro
DESCRIPCIÓN MATERIALES BIOLÓGICOS	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Ovarios	100	Unidades
Suero Fetal Bovino (FBS)	1	Litro
Suero de Albumina Bovina	1	Litro

DESCRIPCIÓN MATERIALES BIOLÓGICOS	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Líquido Folicular (TCM 199)	1	Litro
Suero de Vaca en Celo (SVC)	1	Litro
Hormona FSH	1	Gramos
Hormona LH	1	Gramos

Cuadro 5. Recursos humanos

NOMBRE	DESCRIPCIÓN
Dr. Patricio Garnica	Tutor de la Investigación.
Dra. Mónica Espadero	Responsable de laboratorio y colaboradora de la investigación.
Srta. Priscilla Espin Vargas	Investigadora responsable.

4.2. MÉTODOLOGIA

El presente trabajo investigativo se desarrolló en la Ciudad de Cuenca, Cantón Cuenca, Provincia del Azuay-Ecuador dentro del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

Tuvo una duración de cuatro meses; desde la aceptación del proyecto de investigación dividiendo las mismas en trabajo de campo y laboratorio.

El tamaño de la muestra fue de 25 ovarios, los cuales fueron extraídos de bovinos hembras después de ser sacrificadas en el camal, las mismas que tenían una edad aproximada de 2-7 años.

4.2.1. Investigación de campo.

El presente estudio, se desarrolló en el camal de la ciudad de Cuenca, este sitio fue seleccionado debido a que es un lugar certificado, que cumple con todas las normas de sanidad y bienestar animal, para el sacrificio de animales.

El estudio práctico se inició en horas de la mañana. Se identificaron a las hembras bovinas con una edad que oscilaba entre los 2 y 7 años, posteriormente se procedió a la recolección de muestras de ovarios post mortem; esto se lo realizó con 25-30 ovarios diariamente, para esta actividad se utilizó gorra, guantes, mascarilla, y un bisturí, fue necesario seleccionar los ovarios con la mejor condición física y con la mayor cantidad de folículos, los cuales tenían que estar entre 2 – 8 mm, para la extracción de ovocitos; las muestras se las colocaba en un Cooler con lactato de Ringer temperado a 28°C para luego ser trasladados al laboratorio.

4.2.2. Trabajo en el Laboratorio.

El análisis de las muestras de los ovocitos se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Politécnica Salesiana en la Ciudad de Cuenca.

Para describir el trabajo de laboratorio por una parte se detallará la preparación de los medios tanto de lavado y maduración; así como la preparación de los sueros que se evaluaron. Y como segunda parte se describirá todo el proceso tanto de obtención como de maduración de los ovocitos.

4.2.2.1. Preparación de los medios a utilizarse:

4.2.2.1.1. Preparación del medio de lavado de ovocitos.

Se utilizó 50ml de TL-HEPES+ 0,5ml de Stock de piruvato de sodio (Diluir 11mg de ácido pirúvico seco en 5 ml de solución TL Hepes. Equivalente a 10 ul de piruvato sódico por 1ml de volumen final.)+ 25ul de Gentamicina+ 20ml de suero de albumina bovina.

- Proceso: Se mezclaron los contenidos en tubo de ensayo, tomando en cuenta que el suero de albumina bovina (BSA) se le permitió que se disuelva lentamente. Se ajustó a un pH de 7.3-7.4 y su filtración se lo realizó en un recipiente estéril mediante un calentador deslizante; este se lo calentó antes de su uso.

- Nota: Nunca se coloca el medio tamponado HEPES en la incubadora y es necesario que todos los medios sean preparados en una cabina de flujo laminar estéril.

4.2.2.1.2. Preparación del medio de maduración de ovocitos.

Se utilizó 9ml de medio 199 + 1ml de los sueros en estudio (SVC-FBS)+ 50ul de Stock de piruvato de sodio (Diluir 11 mg de piruvato de sodio en 2,5 ml de medio 199)+ 10ul de Stock de gonadotropinas (se lo prepara añadiendo 3mg de FSH + 3 mg de LH por 1ml de buffer fosfato salino filtrado estéril. Contenido en 1 mg/ml de suero de albumina bovina)+ 5 ul de sulfato de gentamicina.

- Proceso: En primer lugar se mezcló los contenidos invirtiendo el tubo por inmersión.

- Debajo de un gabinete / campana de flujo laminar (banco estéril limpio), se filtró con un filtro de 0,22 micras fijado a una jeringa estéril de 12 ml en un tubo de centrifuga de poliestireno de 12 ml.

- Luego se agregó 10 ul de stock de estradiol. El stock de estradiol se almacena en (-20°C) alícuotas congeladas de 1 ml. Este stock puede ser preparado agregando 1 mg de Estradiol 17-beta por ml de etanol al 95% en un tubo de centrifuga estéril de 5 ml.

- Se homogenizó los contenidos invirtiendo el tubo y esta mezcla se filtró en un tubo de centrifuga estéril de 15 ml con un filtro de jeringa de 0,22 micras fijado a una jeringa estéril de 12 ml.

4.2.2.2. Preparación de los sueros en estudio:

4.2.2.2.1. Suero de vaca en celo (SVC).

- Proceso: Se identificó una hembra bovina en estro, para posteriormente tomar dos muestras de sangre (2 tubos vacuutainer).

- Se trasladaron las muestras al laboratorio y se centrifugaron por 15 minutos a 2500 rpm.

- Una vez que se formó el suero en el tubo (el suero es el material amarillo/anaranjado formado en la parte superior de la sangre/ material rojo que está en la parte inferior del tubo), se lo recupero pipeteando y se lo colocó en otro tubo estéril limpio.

- Se filtró el suero utilizando filtros estériles de 0,4 o 0,45 micras para remover los contaminantes. Se recomienda utilizar tubos estériles limpios como envase.

- El suero ya filtrado, se activó a 56°C durante 30 minutos, utilizando baño maría a la temperatura mencionada.

- Luego de ser activado el suero, este se enfrió en el interior de la campana de flujo laminar (banco estéril limpio).

- Inmediatamente de ser enfriado, se filtró el suero usando un filtro estéril de 0,2 o de 0,22 micras para remover todos los contaminantes bacterianos.

4.2.2.2.2. *Suero fetal bovino (FBS).*

- Este tipo de suero se lo importo del país de Francia, debido a su complejidad para su preparación.

4.2.2.3. *Proceso de preparación de ovarios para la aspiración de ovocitos.*

Una vez con los ovarios en el laboratorio se los ubicó en un colador y se los lavó en lactato de Ringer, para finalizar el proceso se pasaba a un baño rápido de alcohol al 70 %.

Estos ovarios previamente lavados se los colocó en un vaso de precipitación, el cual estaba previamente temperado a 37°C.

Posteriormente se procedió a realizar la aspiración de los folículos (2-8mm), mediante la utilización de una jeringa de 10ml y una aguja hipodérmica de 18X20G. El contenido de la jeringa se lo situó en un tubo de ensayo de 50ml temperado a 37°C, descargando por la pared del tubo y sin la aguja. Luego se dejó sedimentar los ovocitos de 10-15min.

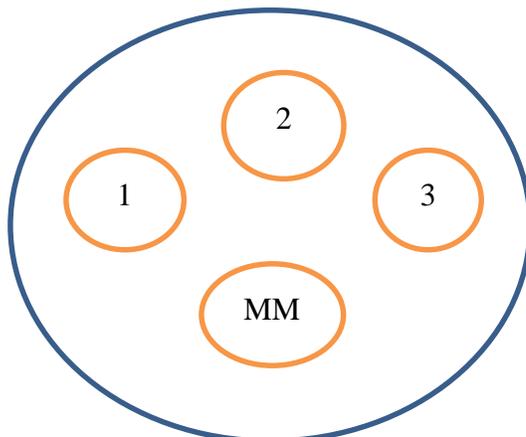
En seguida se preparó una placa de Petri de 90mm que contenía lactato Ringer (1ml) y 0,5ml de albumina bovina, esto como medio de clarificación para la búsqueda de los ovocitos.

Transcurrido el tiempo de sedimentación se utilizó una pipeta calibrada para 1000 ul con punta azul, con el propósito de retirar los ovocitos y colocar los mismos en la placa de clarificación para finalmente llevarlos al microscopio e iniciar la búsqueda de ovocitos.

4.2.2.3.1. *Lavado de ovocitos.*

En una placa de Petri de 90mm se colocó 3 gotas de 100ul de medio de lavado de ovocitos y una última gota (100ul) de medio de maduración.

Figura 11. Disposición de medios para su consecutivo lavado



En esta placa de Petri del lavado de ovocitos se procedió a ubicar los ovocitos obtenidos de la placa de clarificación, lavándolos secuencialmente en cada gota hasta llegar a la gota del medio de maduración, con el propósito que estos se acondicionen a las propiedades del medio en el cual finalmente serán madurados.

4.2.2.3.2. Maduración de ovocitos.

- Para empezar se realizó la limpieza del gabinete / campana de flujo laminar rociando y esterilizando las superficies con etanol al 70%.
- Se preparó el plato de cultivo de ovocitos (se recomienda preparar un plato adicional para control y soporte en caso de que ocurra daño) pipeteando 70 ul del medio de maduración, para cada gota que se colocó en las placas de Petri estériles (se utilizaron 5 gotas/placa de Petri), las cuales deben estar previamente rotuladas con fecha y nombre del suero que se está evaluando.
- Se evaluaron de 10-15 ovocitos por gota (se recomienda no colocar más de 15 ovocitos/gota).
- Se superpuso las gotas de cultivo con aceite mineral estéril. Se tuvo cuidado de no sobrellenar el aceite mineral porque el sobrellenado hace que la tapa se selle en la placa y evita el equilibrio.

- Los platos de cultivo estuvieron previamente pre-equilibrados por un mínimo de 2 horas en la incubadora antes de la distribución de los ovocitos.

4.2.2.3.3. Evaluación de ovocitos.

Una vez colocados los ovocitos en el medio de maduración y estos en la incubadora, se procedió a evaluar a las 24 horas su maduración; se efectuó el conteo de ovocitos madurados por cada gota y se los categorizó en A B C (cuadro 6).

4.2.3. Diseño estadístico.

El método a aplicar en el presente proyecto para el análisis de datos, corresponde a la estadística inferencial; debido a que se utilizó Suero Fetal Bovino (FBS) y Suero de Vaca en Celo (SVC) como medios de maduración.

4.2.3.1. Variables en estudio

4.2.3.1.1. Variables Dependientes.

Cuadro 6. Variable dependiente: Ovocitos

CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADORES	INDICE
Evaluar la maduración de ovocitos bovinos mediante la utilización de dos medios de maduración diferentes.		Número de ovocitos	Número
	Físicos	Clasificación de ovocitos	Número

4.2.3.1.2. Variables Independientes.

Cuadro 7. Variable independiente: Medios de maduración

CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADORES	INDICE
Maduración de ovocitos en Suero Fetal Bovino (FBS), y Suero de Vaca en Celo (SVC).	Química	Grado de maduración	Porcentaje

4.2.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se lo efectuó mediante:

- Conversión de datos mediante $\sqrt{X+0,5}$
- DBA (Diseño de bloques al azar con submuestras)
- Análisis de varianza
- Prueba de Duncan
- Gráficos en círculos y columnas.

4.3. POBLACIÓN Y MUESTRAS

4.3.1. Material experimental.

Se utilizaron 25 muestras de ovarios de bovinos del camal de la ciudad de Cuenca, los cuales estuvieron en las mismas condiciones medio ambientales y se utilizó el mismo protocolo tanto para su recolección y posterior análisis, quedando de la siguiente manera:

4.3.2. Selección de la muestra.

El muestreo se efectuó aleatoriamente en horas de la mañana, tomando 25-30 muestras por visita, debido a que no todas tenían las características deseadas para el estudio; el mismo que se lo desarrolló en seis ocasiones diferentes.

4.4. CONSIDERACIONES ETICAS

Para el desarrollo de la investigación aquí planteada se tomó en cuenta el bienestar animal y el texto de la Norma ISO 26000.

La recolección de muestras de ovarios se lo realizo en el camal de la Ciudad de Cuenca, la misma que cuenta con personal profesional y altamente capacitados que hacen uso de procedimientos y técnicas que se encuentran dentro del marco de bienestar animal al momento de realizar el sacrificio de animales domésticos para el consumo humano.

Los ovarios fueron obtenidos de hembras bovinas post-mortem utilizando protocolos que no incurrieran con el trabajo, ni salud tanto de los operarios presentes como de la persona que se encontraba realizando el estudio. El uso de mascarillas, gorra, guantes, botas y ropa adecuada conjuntamente con la utilización de materiales para extraer y preservar la integridad de los ovarios hasta llevarlos al laboratorio; fueron practicas muy indispensables dentro del estudio.

Para la manipulación y análisis de los ovarios dentro del laboratorio, se siguió todos los protocolos de seguridad planteados cuando se efectúa una investigación de este tipo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. DATOS DE MADURACIÓN T1 Y T2 OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

Cuadro 8. Maduración ovocitaria T1. Suero de Vaca en celo –SVC- y T2. Suero Fetal bovino –FBS-.

N# Recolectas/Maduración	SUERO DE VACA EN CELO			SUERO FETAL BOVINO		
	A	B	C	A	B	C
15/08/2018	2	1	0	3	1	0
22/08/2018	8	2	0	9	4	1
23/08/2018	19	2	4	28	5	1
27/08/2018	12	6	8	20	14	9
28/08/2018	15	6	2	17	7	8
29/08/2018	16	2	5	18	8	0
Sub Total:	72	19	19	95	39	19
Total SVC:	110			Total SFB:	153	

Categorización ovocitaria:

*A: Corresponde a un ovocito con células del cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente.

*B: Tiene capas múltiples del cúmulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.

*C: Se caracteriza por tener un cumulus denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras

Fuente: (Sánchez et al., 2006, Vol.16, pp. 1-35).

5.2. TRANSFORMACIÓN DE DATOS

Cuadro 9. Datos obtenidos de cada tratamiento

T1. Tratamientos Suero Vaca en Celo				T2. Tratamientos Suero Fetal Bovino			
REPETICIONES	A	B	C	Repeticiones	A	B	C
I	2	1	0	I	3	1	0
II	8	2	0	II	9	4	1
III	19	2	4	III	28	5	1
IV	12	6	8	IV	20	14	9
V	15	6	2	V	17	7	8
VI	16	2	5	VI	18	8	0

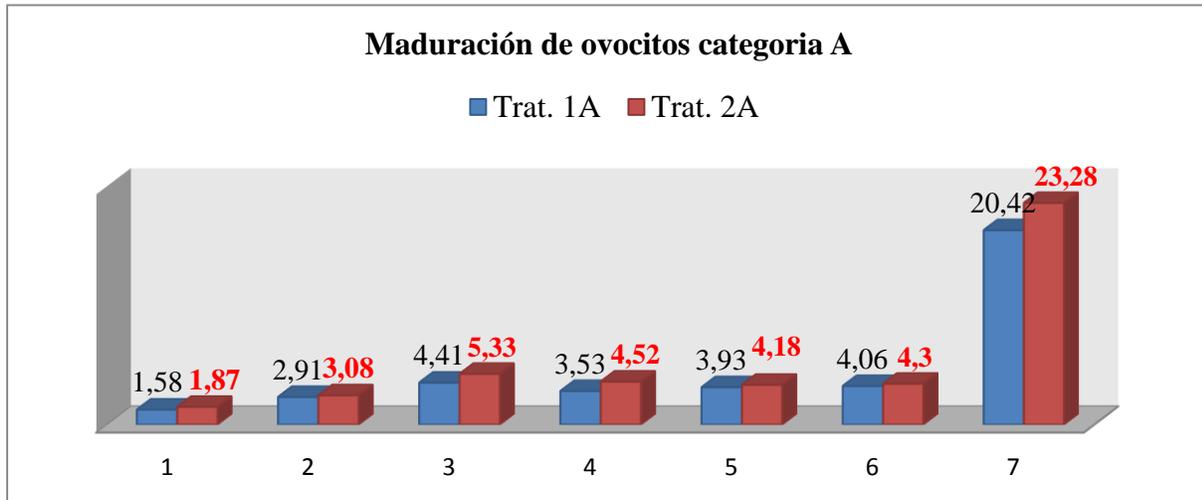
Cuadro 10. Transformación de datos mediante $\sqrt{X+0,5}$

T1. Tratamientos Suero Vaca en Celo				T2. Tratamientos Suero Fetal Bovino			
REPETICIONES	A	B	C	REPETICIONES	A	B	C
I	1,58	1,22	0,70	I	1,87	1,22	0,70
II	2,91	1,58	0,70	II	3,08	2,12	1,22
III	4,41	1,58	2,12	III	5,33	2,34	1,22
IV	3,53	2,54	2,91	IV	4,52	3,80	3,08
V	3,93	2,54	1,58	V	4,18	2,73	2,91
VI	4,06	1,58	2,34	VI	4,30	2,91	0,70

La Transformación de datos se lo realizo para homogenizar los datos obtenidos en el laboratorio, debido a que en la denominación de ovocitos algunas muestras presentaban 0, lo cual dificultaba el efectuar el análisis y por ende los resultados no serían precisos.

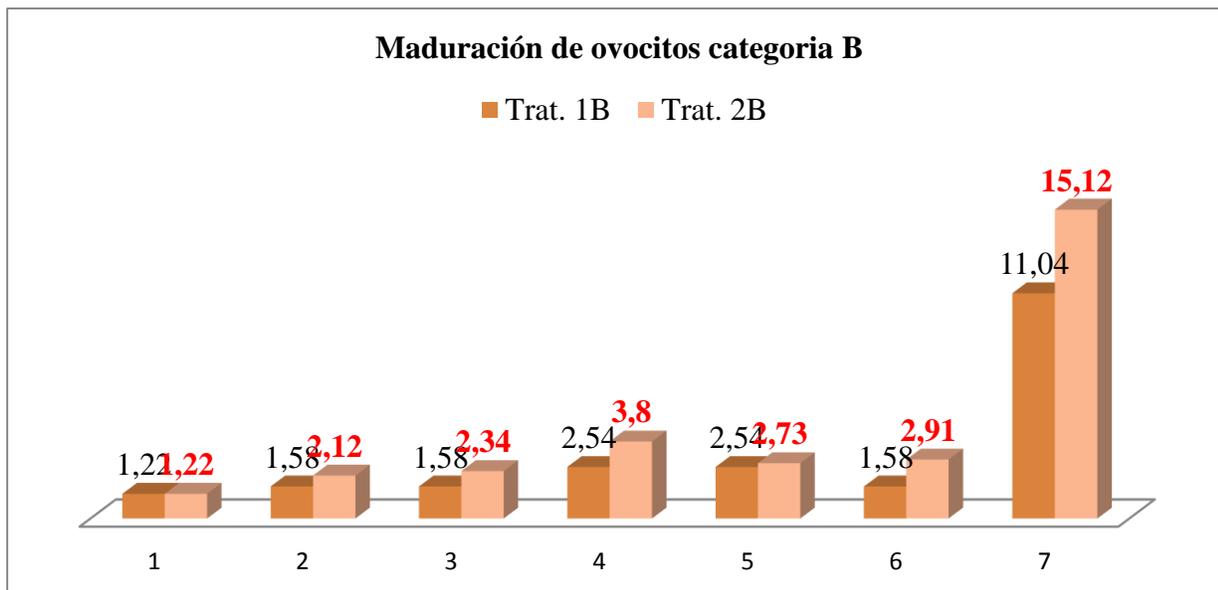
5.3. EVALUACIÓN POR CATEGORÍA DE OVOCITOS EN CADA TRATAMIENTO

Figura 12. Evaluación de maduración ovocitaria de cada tratamiento según la categoría A.



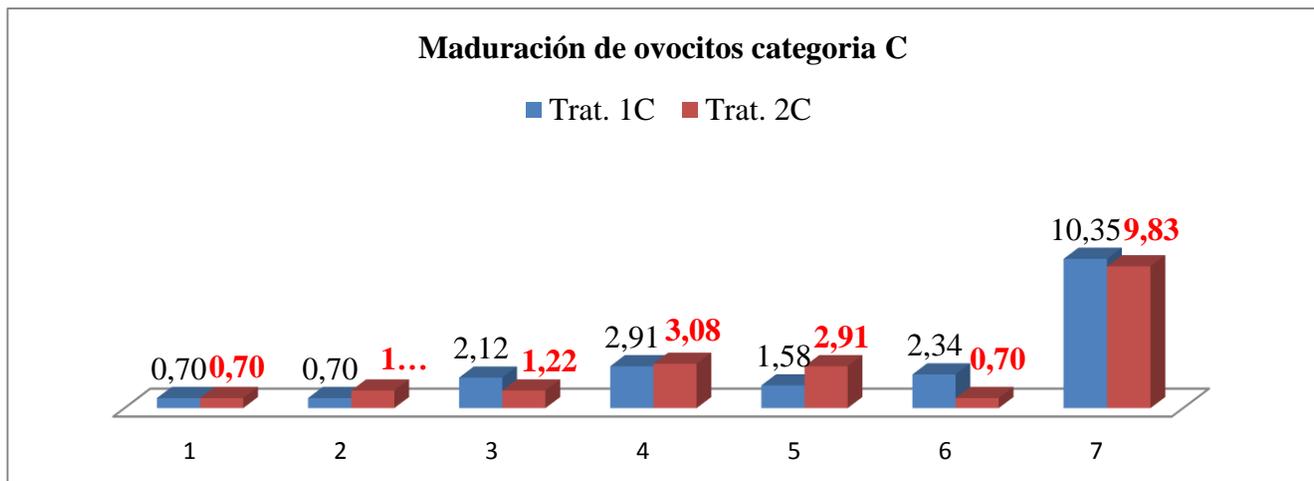
Se puede observar que los ovocitos de categoría A, a lo largo de las 6 repeticiones efectuadas son mucho más eficaces en su maduración utilizando el medio del tratamiento T2_ FBS.

Figura 13. Evaluación de maduración ovocitaria de cada tratamiento según la categoría B.



De la misma manera se puede observar que los ovocitos de categoría B, a lo largo de las 6 repeticiones efectuadas son mucho más eficaces en su maduración utilizando el medio del tratamiento T2_ FBS.

Figura 14. Evaluación de maduración ovocitaria de cada tratamiento según la categoría C.



En la maduración de ovocitos categoría C se puede mencionar que, a lo largo de las 6 repeticiones efectuadas hay mucha más variabilidad, aunque al final estadísticamente resultan más eficaces en su maduración los ovocitos del medio del tratamiento T1_ SVC.

Estos resultados corroboran con King, (2001) quien indica que con la utilización de FBS en el medio los ovocitos de categoría A y B en su investigación obtuvieron un valor de maduración superior al medio suplementado con SVE.

En cuanto a la categoría C, Lorenzo, (1992) menciona que la adición en el medio de maduración de SVC/SVE resulto tener un pequeño porcentaje mayor de maduración frente al que contenía FBS.

5.4. ANÁLISIS MEDIANTE EL DISEÑO DE BLOQUES COMPLETAMENTE AL AZAR CON SUBMUESTRAS

Cuadro 11. Análisis estadístico mediante el Diseño de Bloques con submuestras, con los datos transformados.

Tratamientos = 2

Repeticiones = 6

Sub muestras = 3

Total = 36

		Diseño de Bloques al Azar con sub muestras							
TRATAMIENTOS		REPETICIONES						Σ Trat	
		I	II	III	IV	V	VI		
T1 SVC	A	1,58	2,91	4,41	3,53	3,93	4,06		
	B	1,22	1,58	1,58	2,54	2,54	1,58		
	C	0,70	0,70	2,12	2,91	1,58	2,34		
	Tot.U.Exp	3,50	5,19	8,11	8,98	8,05	7,98	41,81	
T2 FBS	A	1,87	3,08	5,33	4,52	4,18	4,30		
	B	1,22	2,12	2,34	3,80	2,73	2,91		
	C	0,70	1,22	1,22	3,08	2,91	0,70		
	Tot.U.Exp	3,79	6,42	8,89	11,40	9,82	7,91	48,23	
Σ .Rept		7,29	11,61	17,00	20,38	17,87	15,89	Σ .total=	90,04
								\bar{x} total=	2,50111

5.5. ANÁLISIS DEL DISEÑO DE BLOQUES COMPLETAMENTE AL AZAR CON SUB MUESTRAS:

1) Factor Calcular = $(\sum x_{ijk})^2 / t.r.m$

FC. = 225,200

2) Suma cuadrados totales = $\sum x^2_{ij} - FC$

SC. Tot = 54,9129

3) Suma cuadrados tratamientos = $\sum x^2_i / r.m - FC$

SC. Trat = 1,1449

4) Suma cuadrados repeticiones = $\sum x^2_i / t.m - FC$

SC. Rept = 18,818

5) Suma cuadrados unidad experimental = $\sum \text{total.Exp} / m - FC$

SC U. Exp = 20,6848

6) Suma cuadrados error experimental = SC U.Exp – SC. Rept - SC Trat

SC E. Exp = 1

7) Suma cuadrados error muestral = SC Tot- SC Rept - SC Trat - E.Muest

SC E. Muest = 34

5.6. ANÁLISIS DE VARIANZA Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN

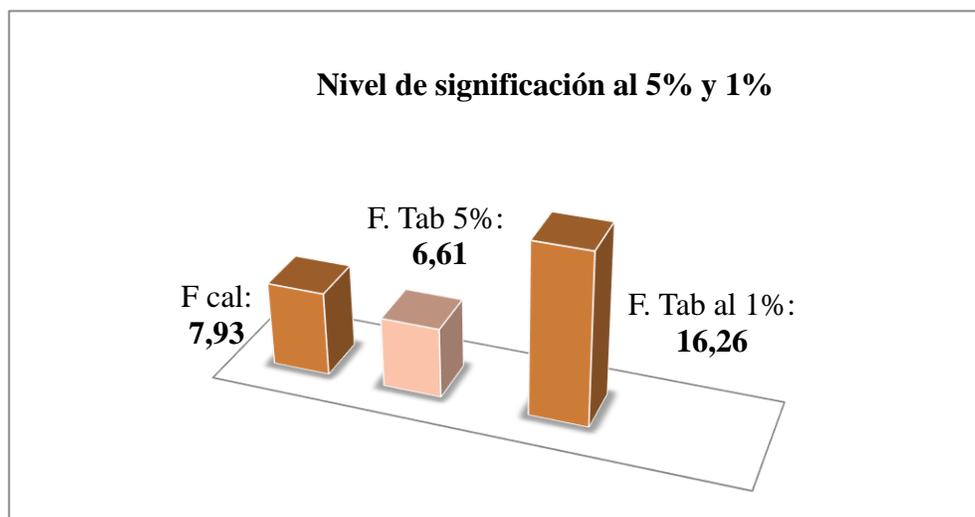
Cuadro 12. Análisis de varianza con los resultantes de análisis de DBA con sub muestras.

ADEVA						
F de V	gl	SC	CM	F cal	F tab 5%	1%
Total	35	54,913	-----	-----	-----	-----
SCTratamientos	1	1,1449	1,1449	7,93	6,61	16,26
					Altamente significativo **	No significativo NS
SC Repeticiones	5	18,818	3,76364	26,07	5,05	10,97
					Altamente significativo **	Altamente significativo **
E. Experimental	5	1	0,14434			
E. Muestral	24	34	1,4261722			

Coeficiente de Variación = $\sqrt{\text{CME.Exp} / \bar{x} \text{ total}} * 100$

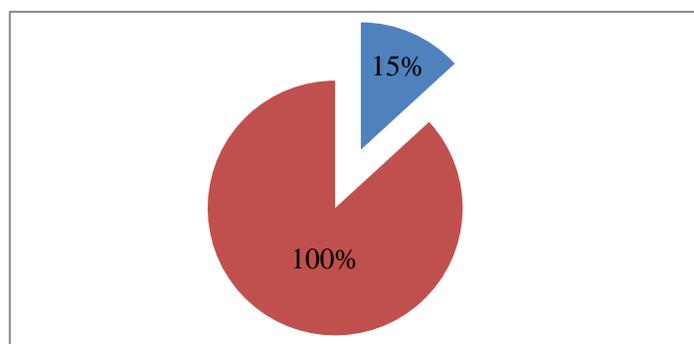
CV = $\sqrt{0,14434 / 2,50111} * 100 = 15 \%$.

Figura 15. Grafica de Nivel de significancia



Como se puede observar en la figura 15. Mediante el análisis del DBA con submuestras, se obtuvo un F. calcular del 7,93 frente a F. tabular al 5% y 1% que es de 6,61 y 16,26 respectivamente, lo que indica que es Altamente Significativo** al 5% y No Significativo NS al 1%. Con esto concluimos que los tratamientos T1 y T2 se comportan de manera diferente.

Figura 16. Grafica de Coeficiente de Variación



El CV fue del 15,19%, lo que me da una confiabilidad de los datos recopilados.

5.7. ANÁLISIS DE SIGNIFICACIÓN

Luego de haber desarrollado el análisis de varianza, se aplicó la prueba de significación Duncan para de esta manera observar mediante las medias de los tratamientos quien fue el que mejor resultados obtuvo.

5.7.1. Prueba de significación Duncan.

- gl error experimental= 5
- Repeticiones= 6
- Tratamientos= 2
- Cuadrado medio del error experimental (CME. Exp.)= 0,14434
- Submuestras= 18

Medias de los Tratamientos:	
T. A:	41,81
T. B:	48,23

Desarrollo		
Medias Tratamientos / Submuestras	T. A:	2,322
	T. B:	2,679

Fórmula para aplicar la prueba Duncan:

$$s/x = \sqrt{\text{CME. Exp.} / \text{Repeticiones}}$$

$$\text{Valor de } s/x = 0,1551021169$$

Valores para medias	B	A
RMD	3,64	3,74
RMS	0,56	0,58

Los valores RMD fueron obtenidos a 5 grados de libertad de la tabla de valores de rango mínimo Duncan, mismos que fueron considerados al 5%. Los valores RMS son el resultado de los valores de RMD multiplicados por el valor obtenido de s/x .

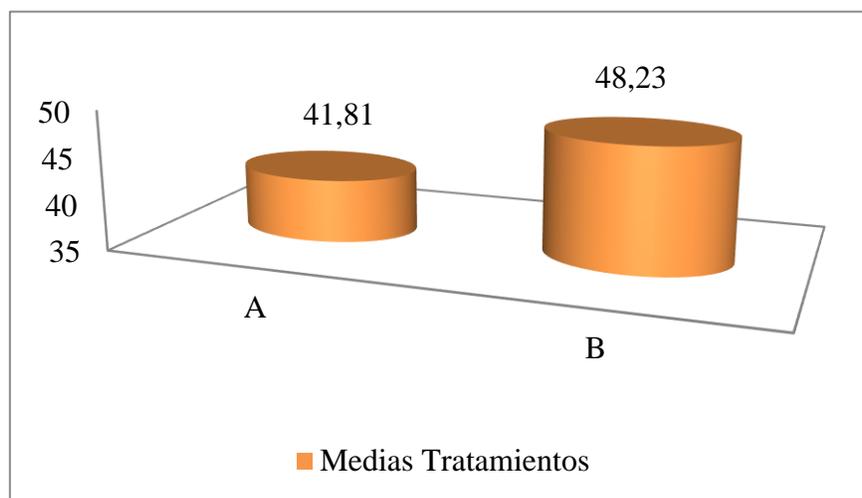
Tratamientos N°	T. A	T. B
Medias Tratamientos	41,81	48,23

Conclusión		
Media (T.B) - RMS=	47,649	Altamente significativo ** Trat: A
Media (T.A) - RMS=	41,245	No significativo NS Trat: A; B

Como se puede observar el valor de la media del T.B es igual a 47,649, mismo que es superior a 41,81 que es la media del T.A dándonos altamente significativo **.

Por otro lado la media del T.A fue igual a 41,245, mismo que es menor a la media del T.B 48,23, dándonos No significativo NS.

Figura 17. Representación de las medias de los tratamientos en estudio



Como se puede apreciar en la figura 17. El T.B, con una media de 48,23 demostró mejor capacidad de maduración frente a la media de 41,81 del T.A, en cuanto a la maduración de ovocitos se refiere.

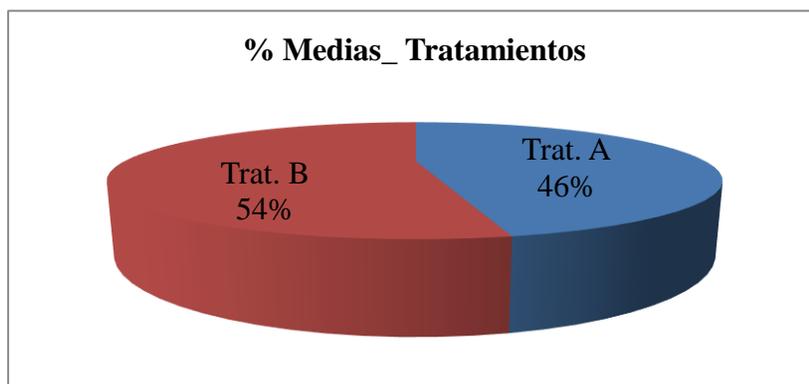
Esto concuerda con Herrera & Jara (2009) quienes exponen que el medio de maduración con FBS demuestra mejores porcentajes de maduración que un medio rico en SVC.

Por otra parte no concuerda con la investigación de Younis et al., (1992), que menciona que el SVC demuestra mejor capacidad para la maduración ovocitaria que el FBS, el autor sustenta que estos resultados pueden deberse al método de obtención y preparación del suero. Así también lo afirma Schellander et al., (1990) y menciona que en ocasiones se trabaja con el suero de vacas sometidas a tratamientos de superovulación, lo cual, modifica las concentraciones hormonales del suero. Por otro lado indica que tampoco se señala la aptitud ni la dieta de los animales utilizados para obtener el suero, lo cual puede también, influir en las concentraciones hormonales de LH, progesterona y sobre todo estradiol.

Wurth & Kruip (1992) sostienen que las diferencias entre los dos tipos de suero se encuentran en las concentraciones hormonales que poseen, ya que, al ser el SVE recogido en las horas inmediatamente posteriores al inicio de los síntomas psicósomáticos del estro, tienen diferencias en las concentraciones de LH, progesterona, estradiol y de prolactina; es por esto que la adición de estas hormonas en algunos estudios han justificado, un aumento de la maduración tanto de la una y disminución de la otra.

Así también lo indica Lorenzo (1992) debido a que en su estudio los datos obtenidos con el SVE fue del 45,6% y del FBS fue del 41,7% es decir tuvo mayor eficacia en la maduración el T1.

Figura 18. Porcentaje de las medias de cada tratamiento.



Se puede observar que con el Trat. A se obtuvo el 46% frente a un 54% del Trat. B; es decir un 8% más en la eficacia de maduración de ovocitos.

5.8. MARCO LOGÍSTICO

Cuadro 13. Costos de la investigación

CONCEPTO	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD	C/U	COSTO FINANCIADO	COSTO EFECTIVO
Laptop	Unidad	1	700,00	700,00	0,00
Cámara digital	Unidad	1	250,00	250,00	0,00
Lápiz	Unidad	1	0,30	0,00	0,30
Esfero	Unidad	1	0,35	0,00	0,35
Papel bond	Resma	1	5,00	0,00	5,00
Marcador	Unidad	1	0,60	0,00	0,60
Carpeta	Unidad	1	0,20	0,00	0,20
Impresora	Unidad	1	150,00	150,00	0,00
Mandil	Unidad	1	35,00	35,00	0,00
Guantes	Caja	1	6,00	0,00	6,00
Mascarillas	Caja	1	6,00	0,00	6,00
Microscopio	Unidad	1	1800,00	1800,00	0,00
Cooler	Unidad	1	35,00	0,00	35,00
Ovarios	Unidad	25	20,00	0,00	20,00
Jeringas 5ml	Caja	1	8,00	0,00	8,00
Jeringas 10	Caja	1	9,00	0,00	9,00
Agujas hipodérmicas	Caja (18'G)	1	12,00	0,00	12,00
Bomba de vacío	Unidad	1	100,00	100,00	0,00
Pipetas	Caja	1	35,00	0,00	35,00
Cajas petri	Docena	1	40,00	0,00	40,00
Vaso de precipitación	Unidad	1	5,00	5,00	0,00

Pinza anatómica	Unidad	1	12,00	12,00	0,00
Solución Salina	Litro	1	20,00	0,00	20,00
Suero Fetal Bovino (FBS)	Litro	1	45,00	0,00	45,00
Líquido Folicular (TCM 199)	Litro	1	45,00	0,00	45,00
Suero de vaca en celo (SVC)	Litro	1	45,00	0,00	45,00
Suero de albumina bovina	Litro	1	65,00	0,00	65,00
Stock gonadotrofinas	Litro	1	200,00	0,00	200,00
TL-HEPES	Litro	1	140,00	0,00	140,00
Stock Piruvato de sodio	Litro	1	122,00	0,00	122,00
Sulfato de Gentamicina	Litro	1	130,00	0,00	130,00
Buffer fosfato salino	Litro	1	45,00	45,00	0,00
Estufa	Unidad	1	1500,00	1500,00	0,00
Filtros	Caja	2	200,00	0,00	200,00
Campana de flujo Laminar	Unidad	1	5000,00	5000,00	0,00
Subtotal				9597,00	989,00
Imprevisto 10%				0,00	98,95
Costo Fin/Costo Efec				9597,00	1088,40
Costo Total				\$10,685,40	

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

Se realizó el análisis del diseño de bloques con submuestras en la evaluación de 2 medios (T1. Suero de Vaca en Celo “SVC” y T2. Suero Fetal Bovino “FBS”), con 6 repeticiones en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, se obtuvo un F calcular del 7,93 frente a un F tabular al 5% y 1% del 6,61 y 16,26 respectivamente lo que me indica que es Altamente significativo ** para el 5% y No significativo NS para el 1%, es decir existe diferencia estadística significativa en el origen de las variaciones que en este caso se denominan como tratamientos, por lo que se concluye que los dos tratamientos tienen diferencia estadística significativa con respecto el uno del otro, por lo que se aprueba la Hipótesis alternativa que indica que cada medio se comporta de diferente forma en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos y se rechaza la hipótesis nula que dice que los medios de maduración no influyen en su comportamiento para la maduración *in vitro* de los ovocitos.

En cuanto al origen de las variaciones de los bloques tenemos un F cal del 26,07 frente a un F tab al 5% y 1% de 5,05 y 10,97 respectivamente, por lo tanto existe diferencia estadística altamente significativa entre bloques y repeticiones.

El Coeficiente de variación es de 15,19 % que para este tipo de investigaciones me da la confiabilidad de los datos al encontrarse dentro del margen permisible.

Gracias al análisis de la prueba de significancia Duncan podemos concluir que el T2 –FBS- con una media de 48,23 es el medio más propicio para la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, debido a que presentó mejores resultados frente al T1 –SVC- con una media de 41,81.

6.2. RECOMENDACIONES

De acuerdo a lo valorado en la presente investigación se recomienda:

- Continuar con este tipo de investigaciones utilizando otros medios de maduración con la finalidad de mejorar la eficiencia de maduración ovocitaria de las hembras bovinas destinadas a PIV (Producción in vitro de embriones) y generar parámetros para que esta actividad pueda potenciarse y llegar a ser un país exportador de embriones.

- Se debería evaluar diferentes concentraciones de SVC (Suero de Vaca en Celo) y FBS (Suero Fetal Bovino) y determinar si existe alguna que sea más óptima para la MIV (Maduración in vitro) de ovocitos bovinos, con el fin de mejorar las tasas de ovocitos madurados después del tratamiento.

- Evaluar la técnica de MIV con animales de razas lecheras frente a razas de carne y de doble propósito con el objetivo de marcar diferencias y fijar la predominancia del factor genético sobre la MIV de ovocitos bovinos.

- Considerar técnicas como la OPU (Ovum Pick Up) y la TAO (Transillumination-aspiration ovary), que permiten recuperar ovocitos de donantes vivas para evaluar diferencias entre estos y ovocitos obtenidos de hembras post-mortem.

- Finalmente, los futuros proyectos de investigación deben orientarse en implementar métodos que permitan obtener la mayor cantidad de ovocitos viables, tras haber sido sometidos a procesos de criopreservación o vitrificación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1. BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., & Hoshi, H. (2003). Evaluación de embriones bovinos producidos en medios sin suero de alto rendimiento. *Journal of Reproduction and Development*, 49(3), 193-202.
- Abe, H., Yamashita, T., Itoh, T., Satoh, T., & Hoshi, H. (1999). Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, 53, 325-335.
- Abe, H., Yamashita, T., Satoh, T., & Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free o serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 57-66.
- Ali, A., & Sirard, M. (2002). Efecto de la ausencia o presencia de diversos suplementos proteicos en el desarrollo adicional de ovocitos bovinos durante la maduración in vitro. *Biology Reproduction*, 66, 901-905.
- Álvarez, A., Pérez, H., De la Cruz, T., Quincosa, J., & Sánchez, A. (2009). *Fisiología animal aplicada* (Primera ed.). Medellín: Universidad de Antioquia.
- Arlotto, T., Schwartz, J., First, N., & Leibfried-Rutledge, M. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology_ELSEVIER*, 45(5), 943-956.
- Armstrong, D., Zhang, X., Vanderhyden, B., & Khamsi, F. (1991). Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 626, 137-158.
- Betts, D., & King, W. (2001). Genetic regulation of embryos death and senescence. *Theriogenology*, 55, 171-191.
- Blondin, O., Coenen, K., Guilbault, L., & Sirard, M. (1997). In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology_ELSEVIER*, 47, 1061-1075.

- Bols, P., Van Soom, A., Ysebaert, M., Vandenheede, J., & De kruif, A. (1996). Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology_ELSEVIER*, *46*, 1001-1014.
- Bols, P., Ysebaert, M., Van Soom, A., & De Kruif, A. (1997). Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology_ELSEVIER*, *47*, 1221-1236.
- Boni, R., Tosti, E., Roviello, S., & Dale, B. (1999). Intracellular communication in in vivo and in vitro produced bovine embryos. *Biology Reproduction*, *61*, 1050-1055.
- Boone, W., & Shapiro, S. (1990). Quality control in the in vitro fertilization laboratory. *Theriogenology*, *33*, 23-50.
- Brinster, R. (1970). Culture of two-cell rabbit embryos to morulae. *Journal of reproduction and fertility.*, *21*, 17-22.
- Brison, D., & Shultz, R. (1997). Apoptosis during mouse blastocysts formation: evidence for a role for survival factors including TGF- α . *Biology Reproduction*, *56*, 1088-1096.
- Byrne, A., Southgate, J., Brison, D., & Leese, H. (1999). Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryos using TUNEL. *Reproduction, Fertility and Development*, *117*, 97-105.
- Castro, A. (1984). *Reproducción Bovina*. San José: Universidad Estatal A Distancia_ EUNED.
- Chen, S., Lien, Y., & Cheng, Y. (2001). Vitriification of mouse oocytes using closed pulled straws achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws and grids. *Human reproduction*, *16*, 2350-2356.
- Chian, R., Nakahara, H., Niwa, K., & Funahshi, M. (1992). Fertilization and early cleavage in vitro of ageing bovine oocytes after Inaduration in culture. *Theriogenology*, *37*, 665-672.
- Crosier, A., Farin, P., Dykstra, M., Alexander, J., & Farin, C. (2001). Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology Reproduction*, *64*, 1375-1385.
- Dorland, M., Gardner, D., & Trounson, A. (1994). Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, *13*, 70.
- Downs, S., D., C., Ward-Bailey, P., & Eppig, J. (1985). Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *822*, 454-458.

- Duque, P., Hidalgo, C., Gómez, E., Pintado, B., Facal, N., & Diez, C. (2003). Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine in vitro embryo development and quality. *Reproduction Nutrition Development*, *43*, 487-496.
- Duran, D., & Monson, R. (Febrero de 2013). PROTOCOLOS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE BOVINO EN VITRO. 1-29. Milwaukee, Wisconsin, Estados Unidos .
- Edwards, L., Williams, D., & Gardner, D. (1998). Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acid act as a buffers of intracellular pH. *Human Reproduction*, *13*, 3441-3448.
- Fair, T., Hyttel, P., & Boland, M. (1996). Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. . *Molecular Reproduction and Development*, *43*, 503-12.
- Farin, P., Crosier, A., & Farin, C. (2001). Influence of in vitro system on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, *55*, 151-170.
- First, N., & Parrish, J. (1987). In vitro fertilization in ruminants. *Journal Reproduction Fertility*, *34*, 151-165.
- First, N., & Parrish, J. (1988). Sperm maturation and in vitro fertilization. *Animal Reproduction Science_ELSEVIER*, *5*, 160-168.
- Fouladi-Nashta, A., Alberio, R., Kafi, M., Nicholas, B., Campbell, K., & Webb, R. (2005). Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive Biomedicine* , *10*, 497-502.
- Fry, R., Niall, E., Simpson, T., Squires, T., & Reynolds, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology_ELSEVIER*, *47*, 977-987.
- Fukui, Y., & Sakuma, Y. (1980). Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and te presence or absence of cumulus cells. *Reproductive Biology*, *22*, 669-673.
- Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y., & Ono, H. (1982). Effect of gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation. *Theriogenology*, *18*, 161-175.
- Fukushima, M., & Fukui, Y. (1985). Effects of gonadotropin and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro. *Animal Reproduction Science*, *9*, 323-332.
- Gandhi, A., Lane, M., Gardner, D., & Krisher, R. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughtout matuartion, fertilization and culture. *Human Reproduction*, *15*, 395-401.

- Gandolfi, F., Luciano, A., Modina, S., Ponzini, A., Pocar, O., Armstrong, D., & Lauria, A. (1997). The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology_ELSEVIER*, *48*, 1153-1160.
- Gardner, D. (1998). Changes in the requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, *49*, 83-102.
- Gardner, D., & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*, *13*, 148-159.
- Geshi, M., Takenouchi, M., Yamauchi, N., & Nagai, T. (2000). Efecto del piruvato sódico en el medio de maduración no sérica sobre la maduración, la fertilización y el posterior desarrollo de ovocitos bovinos con o sin células cumulus. *Reproductive Biology*, *63*, 1730-4.
- Hamano, S., & Kuwayama, M. (1993). In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of the individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology_ELSEVIER*, *39*, 703-712.
- Hochi, S., Kimura, K., & Hanada, A. (1999). Effect of linoleic acid albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology*, *52*, 497-504.
- Imai, K., Kobayashi, S., Goto, Y., Dochi, O., & Shimoshima, I. (1997). Cryopreservation of bovine embryos obtained by in vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. *Theriogenology*, *47*, 347.
- INTA. (Junio de 2010). Memoria técnica curso de graduación. *Producción in vitro y criopreservación de embriones bovinos.*, 1-85. Balcarce, Argentina.
- Krisher, R., Lane, M., & Bavister, B. (1999). Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology Reproduction*, *60*, 1345-1352.
- Kuran, M., Robinson, J., Staines, M., & McEvoy, T. (2001). Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced in vitro in different culture systems. *Theriogenology*, *55*, 593-606.
- Lane, M., & Gardner, D. (2000). Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biology Reproduction*, *62*, 16-22.
- Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruij, T., Niemann, H., & Galli, C. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology Reproduction*, *67*, 767-775.

- Leese, H. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *Reproduction, Fertility and Development*, 82, 843-856.
- Leibfried, L., & First, N. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 48, 76-86.
- Leibfried, M., Critser, E., & First, N. (1986). Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus oocyte complexes. . *Biology Reproduction* , 35, 850-857.
- Lenz, R., Ball, G., Leibfried, M., Ax, R., & First, L. (1983). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. *Biology Reproduction*, 29, 173-179.
- Lim, J., Fukui, Y., & Oho, H. (1992). Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, 37, 351-361.
- Lonergan, P., Carolan, C., & Mermillod, P. (1994). Desarrollo de embriones bovinos in vitro después de la maduración de los ovocitos en condiciones definidas. *Reproduction Nutrition Development*, 34(4), 329-39.
- Lonergan, P., Sharif, H., Monaghan, P., Wahid, H., M., G., & Gordon, I. (1992). Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* , 37, 248.
- Madison, V., Avery, B., & Greve, T. (1992). Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Animal Reproduction Science_ELSEVIER*, 27, 1-11.
- Makarevich, A., & Markkula, M. (2002). Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor 1 during in vitro maturation and culture. *Biology Reproduction*, 66, 386-392.
- Marquant-Leguienne, B., & Humblot, P. (1998). Practical measures to improve in vitro blastocysts production in the bovine. *Theriogenology*, 49, 3-11.
- Menezo, Y., & Khatchadourian, C. (1991). The laboratory culture media. *Assisted Reproduction and Genetics*, 6, 136-143.
- Motlik, J., & Fulka, J. (1986). Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology_ELSEVIER*, 25, 87-96.
- Mucci, N., & Aller, G. (2006). In vitro production of bovine embryos: serum supplementation to the culture media. *Archivo Médico Veterinario*, 2, 38.

- Ocaña, J., & Moreno, M. (1997). INFLUENCIA DE DIFERENTES FRACCIONES FOLICULARES SOBRE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS INMADUROS DE BOVINO. *Archivos de Zootecnia*, 173, 51-59.
- Palasz, A. (1996). Segundo Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal. *Cultivo de embriones bovinos: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos.*, 185-94. Córdoba, Argentina.
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., & Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. . *Molecular Reproduction and Development*, 31, 63-67.
- Pinyopummintr, T., & Bavister, B. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41, 1241-1249.
- Rieger, D., Loskutoff, N., & Betteridge, K. (1992). Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *Theriogenology*, 95, 585-595.
- Rizos, D., Gutiérrez, A., Pérez, S., De La Fuente, J., Boland, M., & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology Reproduction*, 68, 236-243.
- Rorie, R., Lester, T., Miller, G., Gliedt, D., & McNew, R. (1994). Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. *Theriogenology*, 42, 385-395.
- Ruiz, M., León, V., Ruiz, H., Yamasaki, M., & Lau, S. (2015). *Reproducción animal: Producción in vitro de embriones de vacas sacrificadas* (Primera ed.). México: Universidad Autónoma de Chiapas_UNACH.
- Sánchez, R., López, Z., Silva, J., & Berland, O. (2006). In vitro maturation of cat oocytes obtained from females treated with follicle stimulating hormone. *Revista Científica Ciencia Médica*, 16(2), 1-35.
- Seneda, M., Esper, C., Garcia, J., Oliveira, J., & Vantini, R. (2001). Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction science_ELSEVIER*, 67, 37-43.
- Shamsuddin, M., Larsson, B., & Rodriguez, H. (1993). Cultivo de embriones IVM / IVF bovinos hasta estadio de blastocisto en medio definido usando insulina. Transferrina y selenio o factores de crecimiento. *Reproduction in Domestic Animals*, 28, 209-210.

- Shansuddin, M., & Rodríguez-Martínez, H. (1994). Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of Veterinary Medicine*, *41*, 307-316.
- Sirard, M., Coenen, K., & Bilodeau, S. (1992). Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, *37*, 39-57.
- Sugie, T., Seidel, G., & Hafez, E. (1980). Embryo-transfer. *Reproduction in Farm Animals*, editado por E.S.E. Hafez., 569-594. Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos .
- Takahashi, Y., & First, N. (1992). In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, *37*, 963-978.
- Thompson, J. (1997). Comparison between in vivo -derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, *9*, 341-354.
- Thompson, J., Allen, N., & Macgowan, L. (1998). Efecto de la suplementación tardía del suero de ternero fetal al medio de cultivo en el desarrollo de embriones bovinos in vitro y después de la transferencia. *Theriogenology*, *49*, 1239-49.
- Thompson, J., Gardner, D., Pugh, P., McMillan, W., & Tervit, E. (1995). Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biology Reproduction*, *53*, 1385-1391.
- Tornesi, B., & Archer, J. (1993). I Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal. . *Importancia de los componentes de los medios de cultivo en la viabilidad embrionaria*. Córdoba, Argentina.
- Urroz, C. (1991). *Elementos de Anatomía Y Fisiología Animal*. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia_ EUNED.
- Van Winkle, L. (2001). Amino acid transport regulation and early embryo development. *Biology of Reproduction*, *64*, 1-12.
- Voelkel, S., & Hu, Y. (1992). Efecto de la atmósfera de gas en el desarrollo de embriones bovinos de una sola célula en dos sistemas de cultivo. *Theriogenology*, *37*, 1117-1131.
- Walker, S., Heard, T., & Seamark, R. (1992). Cultivo in vitro de embriones de oveja sin cocultivo: éxitos y perspectivas. *Theriogenology*, *37*, 111-126.
- Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G., & Bunch, T. (1997). The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Animal Reproduction Science*, *48*, 37-45.

- Wani, N. (2002). In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*, 44, 89- 95.
- Wurth, Y., & Kruip, A. (1992). Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes. *Animal Reproduction*, 1, 387-389.
- Xu, K., Greve, T., Smith, S., & Hyttel, P. (1986). Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 27, 505-519.
- Younis, A., & Brackett, B. (1992). Thyroid stimulating hormone enhancer of bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 31, 144-151.
- Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P., Yang, X., & Godke, R. (1995). Función de cúmulos durante la maduración de ovocitos bovinos, la fertilización y el desarrollo de embriones in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 40, 338-44.
- Zuelke, R., & Brackett, B. (1990). Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation in bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology. Reproduction*, 43, 784-787.

7.2. LINCOGRAFÍA

- Flores, F. (13 de Octubre de 2012). <http://repositorio.unap.edu.pe>. Recuperado el 24 de Septiembre de 2018, de COLECCIÓN, CULTIVO Y MADURACIÓN IN VITRO, DE OVOCITOS DE VACAS (Sos Taurus) EN EL ALTIPLANO BOLIVIANO: <http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/353/EPG690-00690-01.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Freitas, C. (2004). <https://cdn.fsbx.com>. Recuperado el 02 de Agosto de 2018, de MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS: MEDIOS DE CULTIVO Y FACTORES DE CRECIMIENTO: https://cdn.fsbx.com/v/t59.2708-21/37848623_2291139284230352_8532752913544511488_n.pdf/Maduraci%C3%B3n-de-ovocitos-bovinos-in-vitro.pdf?_nc_cat=0&oh=638536634ac3557a14d89ceb43f65c12&oe=5B660D92&dl=1
- Gutiérrez, C. (2006). <http://repositorio.uchile.cl>. Recuperado el 14 de Agosto de 2018, de EVALUACIÓN DE LA SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO CON PIRUVATO SOBRE LA MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS CANINOS: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130838/Evaluaci%C3%B3n-de-la-suplementaci%C3%B3n-del-medio-de-cultivo-con-piruvato-sobre-la-maduraci%C3%B3n-In-Vitro-de-ovocitos-caninos.pdf?sequence=1>
- Herrera, L., & Jara, O. (22 de Enero de 2009). <http://repository.lasalle.edu.co>. Recuperado el 2 de Septiembre de 2018, de COMPARACIÓN DE DOS SUPLEMENTOS PARA MADURACIÓN DE OVOCITOS OVINOS IN VITRO: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5817/T14.09%20H433c.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Herradón, P., Quintela, L., Becerra, J., Ruibal, S., & Fernández, M. (2007). <http://www.alpa.org.ve>. Recuperado el 29 de 07 de 2018, de Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora Genética en Bovinos.: http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2015%20Supl/p_herradon.pdf
- Hincapié, J. (2010). <https://investigacion.uaa.mx>. Recuperado el 30 de 07 de 2018, de Memoria técnica curso de graduación: Preparación de las columnas de percoll.: https://investigacion.uaa.mx/seminario/memoria_abstracts/15seminario/abs15sem.pdf
- Lorenzo, P. (1992). <https://biblioteca.ucm.es>. Recuperado el 19 de Agosto de 2018, de MADURACION IN VITRO DE OOCITOS DE GANADO VACUNO: <https://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/D/2/AD2007601.pdf>

- Martínez, Y. (Junio de 2013). <http://digibuo.uniovi.es>. Obtenido de Maduración ovocitaria :
<http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM%20Yaiza%20Martinez.pdf>
- Moor, R. (Junio de 1990). <http://web.uchile.cl>. Obtenido de Oocyte maturation. En: Fertilization in mammals. U.S.A: Sero Symposium.:
http://web.uchile.cl/vignette/avancesveterinaria/CDA/avan_vet_simple/0,1423,SCID%253D8629%2526ISID%253D424%2526PRT%253D8625,00.html
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F., & Alberio, R. (02 de Agosto de 2005). <https://scielo.conicyt.cl>. Recuperado el 10 de Agosto de 2018, de Producción in vitro de embriones bovinos : suplementación de los medios de cultivo con suero:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000200002
- Santa Cruz, C. (2012). <http://cybertesis.unmsm.edu.pe>. Recuperado el 30 de 07 de 2018, de Efecto de tres suplementos macromoléculas (pva, pvp y bsa) sobre la tasa de maduración, división y desarrollo embrionario in vitro de ovocitos bovinos procedentes de ovarios obtenidos de camal.:
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/1546/Santacruz_pc.pdf;jsessionid=44EACA1DEDF14803A9692BC85F9A9BB?sequence=1
- Zárate, O. (Diciembre de 2006). <https://cdigital.uv.mx>. Recuperado el 31 de Julio de 2018, de Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos:
<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/9755/maestria%20Oscar%20Zarate%20Guevara.pdf;jsessionid=80E29729137AB2DC11B0D0485C898C47?sequence=2>

VIII. APÉNDICES/ ANEXOS

IX. FOTOGRAFÍAS



Foto #1: Muestra de sangre de bovino hembra en estro.



Foto #2: Centrifugación de la muestra de sangre de bovino hembra en estro.



Foto #3: Suero de Vaca en celo (SVC)



Foto #4: Preparación de medios

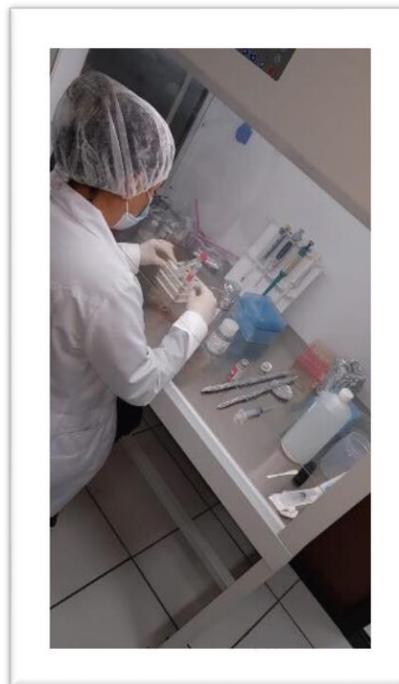


Foto #5: Preparación de medios en campana de flujo laminar

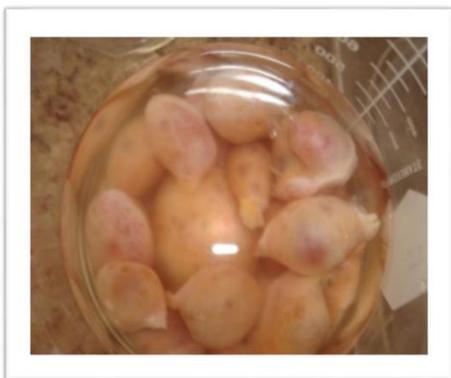


Foto # 6: Ovarios lavados y listos para aspiración

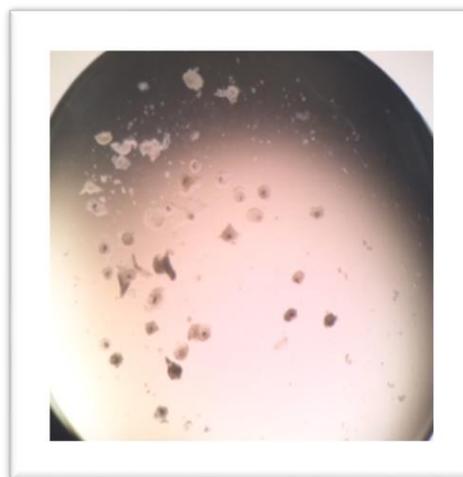


Foto #7: Lavado y selección de ovocitos bovinos (Placas con medios de lavado de ovocitos)

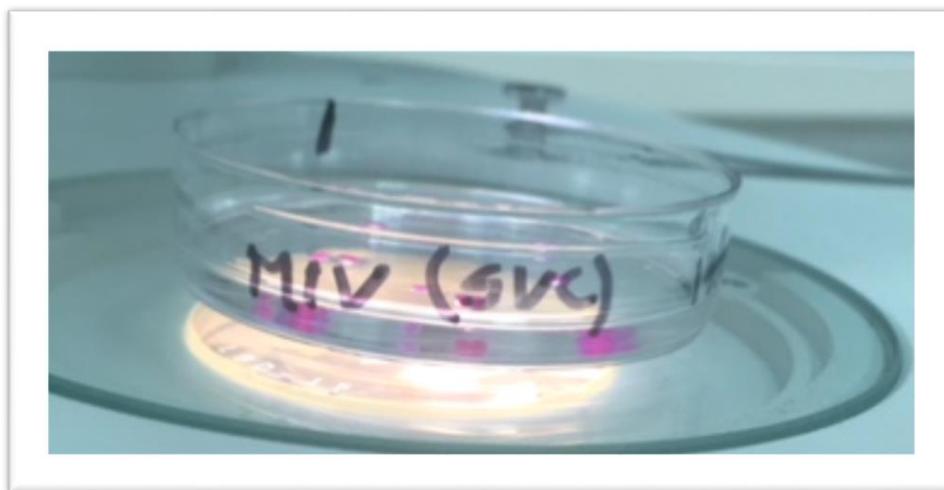


Foto #8: Placa de maduración de ovocitos bovinos con Suero de Vaca en Celo (SVC)

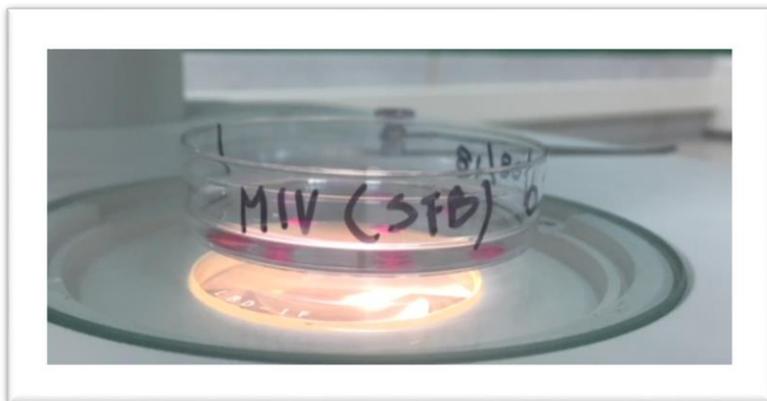


Foto #9: Placa de maduración de ovocitos bovinos con Suero Fetal Bovino (FBS)

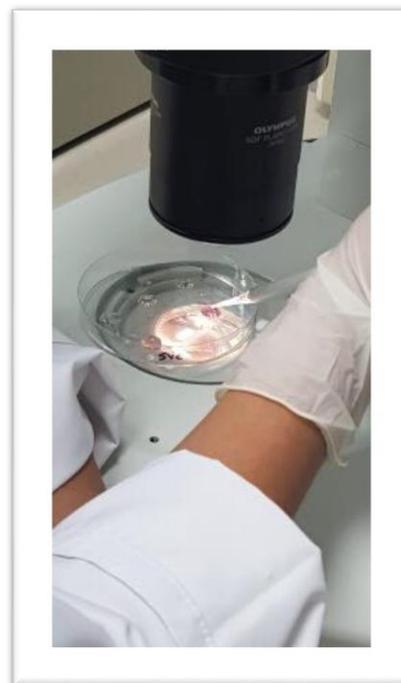


Foto #10: Lavado de ovocitos bovinos (Placas con medios de lavado de ovocitos)



Foto #11: Selección de ovocitos para su posterior maduración

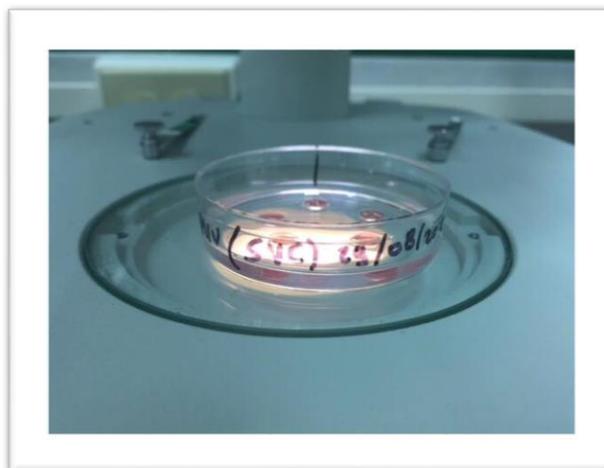


Foto #12: Maduración de ovocitos en Suero de Vaca en Celo (SVC)



Foto #13: Maduración de ovocitos en Suero de Vaca en Celo (SVC)

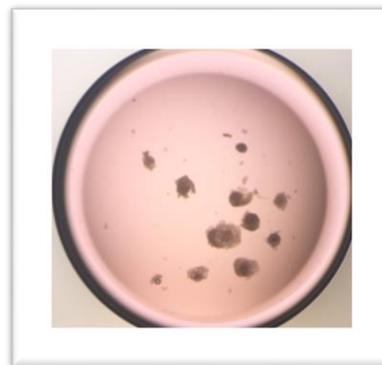


Foto #14: Maduración de ovocitos en Suero de Vaca en Celo (SVC)

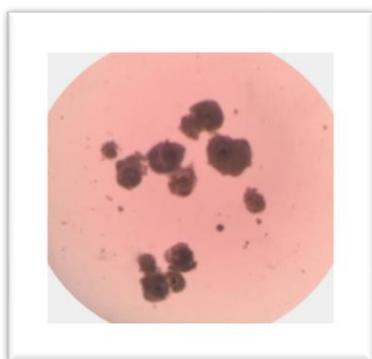


Foto #15: Evaluación de ovocitos en Suero de Vaca en Celo (SVC)

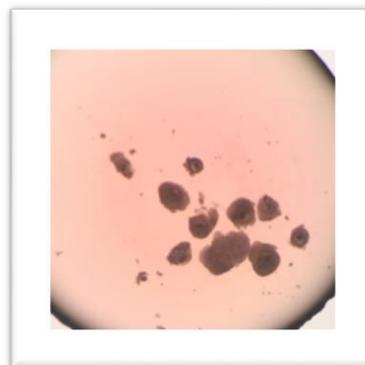


Foto #16: Evaluación de ovocitos en Suero de Vaca en Celo (SVC)



Foto #17: Maduración de ovocitos en Suero Fetal Bovino (FBS)



Foto #18: Maduración de ovocitos en Suero fetal Bovino (FBS)



Foto #19: Maduración de ovocitos en Suero fetal Bovino (FBS)



Foto #20: Evaluación de ovocitos en Suero fetal Bovino (FBS)

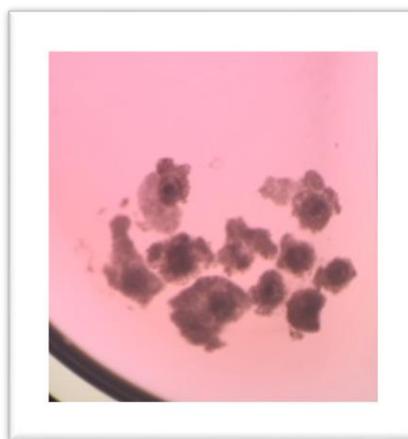


Foto #21: Evaluación de ovocitos en Suero fetal Bovino (FBS)