

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

EVALUACIÓN Y EFECTO DE LA GnRH Y LH EN LA MADURACIÓN Y  
FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS RECOLECTADOS  
DE VACAS BROWN SWISS POST MORTEM  
EN LA REGIÓN DE PUNO.

**TESIS**

Presentado por:

**Bach. EVER LUIS CHURA CHURA**

Para optar el Título de:

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

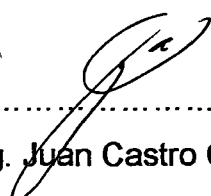
**TACNA - PERÚ**

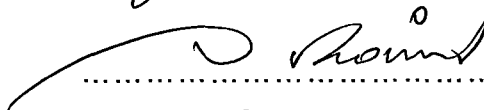
**2011**


**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**  
**Y ZOOTECNIA**

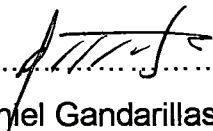
**“EVALUACIÓN Y EFECTO DE LA GnRH Y LH EN LA MADURACIÓN Y  
FERTILIZACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS RECOLECTADOS  
DE VACAS BROWN SWISS POST MORTEM  
EN LA REGIÓN DE PUNO”**

Tesis sustentada y aprobada el 02 de diciembre del 2011, siendo integrado el jurado calificador por:

PRESIDENTE :   
Mg. Juan Castro Cancino

SECRETARIO :   
MSc. Luis Ramos Mamani

VOCAL :   
MV. Luis Barrios Moquillaza

ASESOR :   
MSc. Daniel Gandarillas Espezua

## DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar a este momento tan especial  
en mi vida, por permitir equivocarme  
y poder corregir mis errores.

A mis padres por haberme educado, gracias a ellos estoy a  
punto de convertirme en MVZ. Después de todo llegué al  
final lo conseguí y espero que al menos se sientan  
orgullosos de mí, porque  
para mí siempre son los mejores. A mis  
hermanas, porque siempre he contado  
con ellas para todo, gracias por la  
confianza que siempre me  
han tenido.

## AGRADECIMIENTO

Cuando empecé con la ejecución de mi tesis, tenía textos y papers leídos, muchas hojas imprimidas, es ahí cuando uno se da cuenta que cuanto más lees más preguntas tienes ¿realmente funcionara esto? y si a esto le sumamos el tiempo transcurrido, las huelgas, los resultados preliminares nada alentadores. Es ahí cuando las fuerzas se te desvanecen, cuando pareciera que estamos equivocados que estamos fuera de la realidad. Es en esos momentos de la vida, hay quienes nos embarcamos en uno de los viajes más desafiantes, aquellos en los que pareciera que arriesgamos todo al servicio del sueño, del proyecto, de la meta. Esa travesía tan llena de surcos, de susurros maliciosos que te impulsan a abandonar todo, de sonrisas amables, de palabras por las que todo vale la pena... esa travesía en la que el mundo pasa por encima y uno simplemente decide qué hacer con ellos, es cuando una palabra de aliento se convierte en un arma poderosa una energía capaz llevarnos adelante, este apoyo no deviene de recursos técnicos ni financieros, es el apoyo al alma, a fortalecer la voluntad, la perseverancia lo que nos conduce a alcanzar finalmente los objetivos trazados... es ese motor tan transformador, que regala la confianza y la creencia de los otros en lo que estás haciendo.

Gracias a todos mis docentes, en especial al Dr. Gandarillas por ayudarme con mi tesis, al Dr. Barrios por haberme enseñado tanto en el aula como en el campo, al Dr. Elcorobarrutia por ser más que un profesor un amigo gracias por insistir tanto más este trabajo también es para darte la satisfacción de ver a uno de tus estudiantes culminar con sus estudios, al Dr. Olivera por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio por ser un gran profesional todo un ejemplo para mí de lo que me gustaría llegar a ser algún día

Agradezco de manera especial a Grisveli, Por llevarme siempre cerca aun cuando yo estaba lejos. Por la amistad que nos une después de tantos años y que espero, que a pesar del tiempo y la distancia perduren para siempre. Por ser más que una

amiga para mí...una ángel que nunca olvidare. A karencita por las innumerables horas que hemos compartido dentro y fuera de la U. Gracias por ser una parte significativa de mi vida, por demostrarme que además de haber conocido a una gran persona, encontré una gran amiga. A Yeni, Yolina y Silvia que me enseñaron a querer a los animales. Mas sin ellas no sería un Médico Veterinario completo ps curar a los animales por dinero es humano mas ser sensibles al dolor de los animales y dar todo por ellos sin esperar nada a cambio es divino. Que Dios les bendiga. A Velyn quien quizás sin saberlo hizo de mi mejor estudiante cada día llenándome de motivos e inquietudes que me han guiado todo el largo proceso de mi educación universitaria, gracias siempre te llevare presente. A Nidia imprescindible en mi vida. Gracias por repetirme siempre que todo va a salir bien, por creer en mí, porque sin ellos no hubiese dado lo mejor de mí, Gracias por los buenos momentos, por tu amistad. Realmente me siento muy afortunado de haberte conocido. A Jossip por ser un gran amigo, un hermano para mi, gracias por todo.

Gracias a la vida, por haber puesto en mi camino a personas increíbles, por hacerme sentir que de cada uno tenía que aprender tanto y ciertamente me llevo tanto de todos... quiero dedicar un recuerdo agradecido a todas mis amigas que, tanto en la distancia y en la proximidad, son parte más que importante en mi vida: Mary, Miriam, Johanna, Claudia, Yuliana, Liz, Milagros, Massiel, Olivia, Gloria, Marlene a todos ustedes les dedico esta tesis, porque el éxito de este trabajo es tanto mío como de ustedes, Muchas Gracias...

EVER LUIS.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN: .....	01
MARCO TEÓRICO: .....	04
MATERIALES Y MÉTODOS: .....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	48
CONCLUSIÓN: .....	57
RECOMENDACIONES:.....	58
BIBLIOGRAFÍA:.....	59
ANEXOS:.....	66

## **RESUMEN**

El presente estudio sobre maduración y fertilización in vitro de ovocitos bovinos se realizó en la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano en Puno con el objeto de evaluar el efecto de las hormonas GnRH y LH en la maduración y fertilización in vitro de ovocitos inmaduros obtenidos de vacas Brown Swiss sacrificadas en el matadero. Para la experimentación se utilizaron 225 ovocitos, donde el medio base fue TCM-199, se conformaron tres tratamientos con tres repeticiones cada una: T1 sin hormonas; T2 con 0,8mg/ml de GnRH y T3 con 10mg/ml de LH. Los resultados obtenidos indican que se obtuvo un 20% de ovocitos maduros en el tratamiento 2 y un 28% en el tratamiento 3. Lo cual nos demuestra que hubo un mayor número de ovocitos madurados respecto al grupo control en la cual solo se obtuvo un 4% de ovocitos maduros. Por lo que se concluye que la adición de estas hormonas al medio de maduración induce a una mayor tasa de maduración in vitro de ovocitos bovinos sin embargo en este mismo medio no se produjo la fecundación de los ovocitos.

## **I. INTRODUCCIÓN:**

La obtención de la máxima producción en la crianza de cualquier especie animal, requiere fundamentalmente de una buena eficiencia reproductiva; por lo que el impacto de las nuevas tecnologías reproductivas no está limitado solamente a su papel dentro de los sistemas de selección y mejora genética animal; sino que está abierta las posibilidades de implementar sistemas de producción totalmente nuevos y más eficientes (Vivanco, 2000).

La producción in vitro de embriones es un método eficaz no solo para multiplicar sino también para prolongar la vida reproductiva de vacas donantes de alto valor genético aun cuando estas presenten patologías del tracto reproductivo. (Herradon, PG 2007)

Para que la fecundación in vitro pueda llevarse a cabo, es necesario que tanto ovocitos como espermatozoides completen etapas previas necesarias de maduración y capacitación.

Los ovocitos inmaduros de los mamíferos se encuentran en el interior del folículo ovárico rodeado de una masa de células somáticas y mantenidos en un estado de reposo meiótico, estado que se mantiene hasta la llegada de la oleada preovulatoria de gonadotropinas que provocara que el ovocito inicie su maduración nuclear mientras que el cumulus celular se expande y se mucifica. De esta manera, en el momento de la ovulación, el ovocito está rodeado de un cumulus expandido a la vez que nuclearmente a progresado hasta llegar a la metafase de la segunda división meiotica, hecho evidenciado por la expulsión del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino.

Todo el sistema de fecundación in vitro requiere la maduración de los ovocitos, de cuyo éxito depende el de la fecundación. Los ovocitos

inmaduros pueden madurar en un cultivo in vitro bajo condiciones adecuadas, pero que todavía, existen mecanismos no aclarados en la maduración in vitro de ovocitos que permiten que los que han madurado in vivo, puedan fecundarse mejor que aquellos ovocitos madurados in vitro. Debido probablemente a la existencia de factores hormonales o foliculares intraovarios que no son añadidos a los medios y que intervienen en la maduración completa del ovocito.

A lo largo de los años, se han estudiado los factores que favorecen el proceso de la maduración in vitro, en este sentido, los medios de maduración se han suplementado con hormonas y compuestos séricos. Las hormonas se utilizan debido a que las gonadotropinas (FSH y LH) y algunas hormonas esteroideas tienen un papel fundamental en el desarrollo del folículo y en la maduración del ovocito, la suplementación sérica también se ha empleado de manera rutinaria en los medios de maduración in vitro, con el objeto de ofrecer una fuente de proteínas y energía al ovocito durante la maduración.

De esta manera, en este trabajo se analizó los posibles efectos de la GnRH y LH en la maduración de ovocitos sobre los siguientes aspectos: la maduración in vitro de ovocitos y en la fecundación in vitro, para comprobar si, los ovocitos madurados en presencia de estas hormonas, puedan fecundarse correctamente.

Los resultados de maduración de ovocitos del 20% y 24% en un medio adicionado con GnRH y LH respectivamente permiten realizar un esclarecimiento sobre los efectos que puedan tener las dos hormonas, en lo relativo a la maduración y fecundación in vitro de ovocitos

### **1.1. OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar el efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas Brown swiss en Puno.

#### **1.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Evaluar el efecto de la GnRH en la maduración y fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas Brown swiss post mortem.
- Evaluar el efecto de la LH en la maduración y fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas Brown swiss post mortem.
- Determinar la tasa de embriones transferibles obtenidos al 7mo día de cultivo.

### **1.2. HIPÓTESIS**

“Si se maduran y fertilizan, in vitro, ovocitos bovinos en medio de cultivo TCM 199 suplementado con GnRH o LH, en estas condiciones de cultivo los ovocitos expresarán una mayor competencia para el desarrollo lo que se traducirá en la obtención de un mayor número de ovocitos madurados de esta forma se producirá mayor número de ovocitos fecundados.

## II. MARCO TEÓRICO:

### 2.1. Revisión bibliográfica:

#### 2.1.1. Generalidades de la producción in vitro de embriones.

Las grandes expectativas creadas por la producción de embriones in vivo se han visto defraudadas con el tiempo debido al bajo número de embriones transferibles obtenido en cada lavado, la existencia de hembras que no responden a los tratamientos superovulatorios, la necesidad de respetar periodos de descanso entre dos recogidas consecutivas y la obligatoriedad de que la donantes estén en perfectas condiciones ginecológicas, situación difícil de mantener en vacas multíparas. Han creado la necesidad de desarrollar un procedimiento alternativo para la producción de embriones. (Herradon, et al. 2007)

La producción in vitro de embriones se basa en la utilización de ovocitos inmaduros, recogidos de ovarios del matadero o mediante aspiración folicular de vacas donantes de distintas edades y estados fisiológicos. (Gordon 2004)

La producción in vitro de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales: Maduración de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros y cultivo de embriones. Estos tres pasos, comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente. Luego de la maduración in vitro, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar, alcanzan el estadio de metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 hs de comenzada la maduración. De estos,

aproximadamente el 70% es fecundado y comienzan a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto luego del cultivo durante 6-7 días. (Mucci y Col. 2006, Ahuja y Col. 2009)

## **2.1.2. Maduración del ovocito.**

### **2.1.2.1. Maduración del ovocito in vivo**

En especies de mamíferos como la vaca, unas horas antes de la ruptura del folículo y la ovulación, el ovocito totalmente crecido en el folículo preovulatorio se reanuda la meiosis, pasando de la profase I de la primera división meiótica hasta metafase II, este proceso de maduración, que se acompaña de cambios complejos, en el núcleo y citoplasma, transforma el ovocito primario en un ovocito secundario maduro y receptivo a la fertilización y competente para lograr el desarrollo embrionario. (Gordon 2003)

La maduración y la meiosis del óvulo no se completan sino hasta que se termina la fecundación, cuando el ovulo se convierte en cigoto. (Hafez 2002)

#### **2.1.2.1.1. Maduración nuclear.**

Es un proceso necesario para que el ovocito reduzca su carga cromosómica, convirtiéndose en haploide, y así, una vez fecundado por un espermatozoide, pueda dar lugar a un cigoto diploide y viable. (Palma y col. 1993)

La maduración nuclear de ovocitos pre-ovulatorios está regulada por factores presentes en el fluido folicular, por la interacción de ovocitos y células foliculares como también por factores endocrinos, tales como las gonadotropinas. Los ovocitos pueden alcanzar la maduración nuclear cuando estos tienen un diámetro superior a 110  $\mu\text{m}$ , mas, para adquirir la capacidad de desarrollo embrionario, deben estar con un diámetro superior a 120 $\mu\text{m}$  (revisado por Chaves et al 2010).

La maduración nuclear de los ovocitos de la especie bovina se inicia con la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) y la síntesis de proteínas activas que son necesarios para la descondensación de la cabeza de los espermatozoides y para la formación del pronúcleo masculino. La GVBD se caracteriza por la condensación de la cromatina, la desaparición del nucléolo y la desintegración membrana nuclear. (Gordon 2003)

El ovocito sufre su primera división meiótica con la expulsión del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino. El ovocito, que ahora se denomina un ovocito secundario, comienza la segunda división meiótica hasta

llegar a metafase II. La segunda división meiótica se completa con la penetración del espermatozoide al óvulo lo cual es acompañado por la expulsión del segundo corpúsculo polar en el espacio perivitelino. El ovocito en esta etapa contiene el número haploide de cromosomas. (Gordon 2003)

#### **2.1.2.1.2. Maduración citoplasmática.**

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

La maduración citoplasmática es considerada como un conjunto de procesos por el cual el ovocito se convierte en una célula capaz de ser fecundado y poder soportar el desarrollo embrionario. La maduración citoplasmática es necesaria para la obtención de condiciones de bloqueo de la polispermia, para descondensar el núcleo del espermatozoide y formar el pronúcleo masculino después de la fecundación. (Revisado por Chaves et al 2010)

### **2.1.2.2. Maduración in vitro de ovocitos.**

El objetivo de la maduración in vitro es lograr en el laboratorio que los ovocitos sigan las mismas transformaciones durante el periodo de maduración folicular previo a la ovulación, y así, obtener ovocitos viables para la fecundación y desarrollo embrionario. (Gordon 2004)

Bajo el microscopio, el primer signo evidente que la meiosis se reanuda es la disolución de la membrana nuclear (GVBD), la expulsión del primer corpúsculo polar, y la expansión de las células del cumulus que rodean al ovocito. (Gordon 2003).

#### **2.1.2.2.1. Recuperación de ovocitos.**

Los ovocitos inmaduros utilizados para la maduración in vitro pueden ser obtenidos a partir de hembras vivas, mediante la punción de los folículos vía endoscópica o transvaginal, o a partir de los ovarios de hembras sacrificadas en el matadero, este segundo sistema es una fuente barata y fácil de obtener ovocitos para la investigación en la producción de embriones. (Gordon 2004)

Los ovarios recolectados del matadero pueden almacenarse para su transporte al laboratorio hasta un máximo de 11 horas en una solución de cloruro de sodio conteniendo penicilina y estreptomicina mantenidos entre 25-35°C, de esa forma los

resultados de maduración y fecundación in vitro de los ovocitos no se verán comprometidos. (Palomino 2000)

Las principales técnicas utilizadas para obtener los ovocitos bovinos a partir de los ovarios de matadero es mediante la aspiración de folículos debido a la facilidad y la velocidad de la operación, la desventaja de esta técnica se traduce en una mayor alteración de las células del cumulus que rodea al ovocito. Otra técnica frecuentemente usada es el corte o disección del ovario como una forma de recuperar los ovocitos inmaduros de muy buena calidad. La desventaja, el tiempo que toma es tres veces más que la aspiración por ovario otra desventaja además de ser laborioso el corte del ovario en rodajas está expuesto a riesgos de contaminación de los ovocitos durante el procedimiento de extracción. (Revisado por Gordon 2003).

#### **2.1.2.2.2. Factores que afectan la calidad de los ovocitos.**

**2.1.2.2.2.1. Edad de la hembra donante:** a pesar que los folículos con ovocitos totalmente crecidos están presentes en los ovarios de las crías al nacer, los intentos

de utilizar estos ovocitos en la producción de embriones por lo general han sido decepcionantes. Se ha demostrado que las tasas de fecundación y división de ovocitos de ternera de tres meses de edad no difirió significativamente de los ovocitos de vaca pero las tasas de blastocistos fue mucho menor (9-11%) en comparación con las vacas (>20%) lo cual puede estar relacionado con la menor capacidad de desarrollo de los ovocitos de animales pre púberes. (revisado por Gordon 2003).

**2.1.2.2.2. Ciclo estral de la vaca donante:** la mayor calidad de ovocitos se puede obtener de los ovarios en la fase lútea. La capacidad de desarrollo de los ovocitos parece estar influenciada por la presencia de un folículo dominante por lo que la capacidad de desarrollo es significativamente mayor en los

ovocitos recolectados durante la fase de crecimiento folicular que durante la fase de dominancia folicular. (revisado por Gordon 2003).

#### **2.1.2.2.3. Diámetro y aspecto de los**

**folículos ováricos:** los ovocitos de los folículos difieren en su capacidad de desarrollo y que el desarrollo deficiente de los ovocitos de folículos pequeños es probablemente a la incompetencia citoplasmática. Es evidente que cuando el folículo crece al estado preovulatorio el ovocito es expuesto a cambios en el microambiente folicular que influyen en su calidad. (Gordon 2003)

La presencia de un folículo dominante en uno o ambos ovarios tiene un efecto negativo sobre la competencia de los ovocitos, lo cual sugiere que los ovocitos de mayor calidad podrían ser aspirados de folículos en el ovario en

ausencia de un folículo dominante. (Gordon 2003)

### **2.1.2.2.3. Factores que afectan a la maduración del ovocito.**

**2.1.2.2.3.1. Medios de cultivo:** los medios de cultivo empleados en la maduración in vitro se pueden dividir en simples y complejos. Los medios simples contienen solución salina fisiológica con la adición de bicarbonato, piruvato, lactato y glucosa estos medios son suplementados con suero y con trazas de antibióticos. Los medios complejos contienen además de los componentes básicos de los medios simples, los aminoácidos, vitaminas, purinas y hormonas. El medio de cultivo de tejidos 199 (TCM 199) tamponado con bicarbonato y suplementado con diversos sueros y/o gonadotrofinas y/o esteroides ha sido el medio de cultivo más utilizado para el estudio de la maduración de ovocitos. (Gordon 2003)

**2.1.2.2.3.2. La calidad del agua:** el agua es un componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está relacionado con el desarrollo embrionario. (Mucci y col. 2006)

Hay varios grupos básicos de contaminantes que se encuentran en el agua que incluyen sólidos disueltos ionizados y no ionizados, partículas, microbios y pirógenos. La recomendación habitual es preparar medios para la maduración in vitro mediante osmosis inversa, desionizada y agua ultrafiltrada. (Gordon 2003)

**2.1.2.2.3.3. Uso de antibióticos:** un antibiótico ideal para el cultivo de ovocitos debe tener amplio espectro de actividad bacteriana así como la ausencia de toxicidad. El uso de pequeñas cantidades de penicilina (50-100UI/ml) y estreptomycinina (50-100mg/ml) en los medios de

cultivo son incluidos para evitar el crecimiento y la proliferación de microorganismos durante el periodo de cultivo. El uso de sulfato de gentamicina (25-50mg/ml) es una alternativa este antibiótico tolera el autoclave y las altas temperaturas y posee propiedades biológicas y bioquímicas que lo hacen particularmente útil. (Gordon 2003)

**2.1.2.2.3.4. Condiciones de incubación:** la temperatura y la fase gaseosa: la mayoría de los laboratorios llevan a cabo la maduración in vitro de ovocitos a 38-39°C ya que esta cerca de la temperatura rectal de la vaca. Ha habido informes que mencionan que los folículos pre-ovulatorios en el ganado pueden ser casi 2°C más fríos que los tejidos adyacentes en la vaca. Esto ha llevado a la sugerencia de que una temperatura más baja durante la maduración in vitro

puede ser beneficioso. (Gordon 2003)

La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Esto es similar a lo registrado en el oviducto de hembras bovinas. (Revisado por Mucci y col. 2006)

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

**2.1.2.2.3.6. Presencia de las células del**

**cumulus:** las células que rodean al ovocito reciben el nombre de células del cumulus oophorus y lo conforman varias capas de células cilíndricas y entre sus funciones esta el soporte nutricional del ovocito, la síntesis de hormonas esteroideas y la inducción de la reacción acrosómica. La presencia de las células del cumulus durante la maduración in vitro aumenta la fecundación del ovocito y disminuye la polispermia. (Romar 2001)

**2.1.2.2.3.7. Suplementación del medio de**

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

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

### **2.1.3. Fecundación de ovocitos madurados.**

La fecundación es la etapa que asegura la formación de un nuevo individuo a partir de dos gametos, uno masculino y otro femenino y podría ser definido como el conjunto de transformaciones que se producen en el ovocito tras la interacción y fusión de los gametos, que desembocan en la unión de dos lotes haploides de cromosomas y que acaban con la primera división mitótica embrionaria. (Fernández 2004)

El éxito de la fecundación es altamente dependiente de la maduración ovocitaria y de la capacitación de los espermatozoides, por lo que si uno de estos dos procesos no ocurre correctamente se produce el fracaso de la fecundación y/o del posterior desarrollo embrionario. (Alberio 2003)

#### **2.1.3.1. Fecundación in vivo.**

La fecundación en la vaca es un proceso complejo que ocurre normalmente en el ambiente controlado y lo invisible del oviducto. Cuando la vaca es servida por el toro durante el periodo de celo los espermatozoides están presentes en el tracto reproductivo durante varias horas antes de la ovulación (que ocurre de 10-12 horas después del final del periodo del estro). La vida útil de los espermatozoides en el oviducto de la vaca se cree que es del orden de 24 a 48 horas. (Gordon 2003)

#### **2.1.3.1.1. Capacitación del espermatozoide.**

Los espermatozoides deben residir en el aparato reproductor femenino antes de estar en condiciones de unirse al óvulo. Este proceso llamado capacitación del espermatozoide ocurre en la región ístmica del oviducto. Los componentes de la superficie espermática son modificados o eliminados por secreciones del aparato reproductor femenino lo que permitirá la reacción acrosómica necesarios para que el espermatozoide penetre en las estructuras del óvulo y se produzca la fusión de gametos. (Hafez 2002)

#### **2.1.3.1.2. Fijación y penetración del espermatozoide.**

Los mecanismos involucrados en la fijación del espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito se basa en la interacción de las proteínas de unión presentes en la superficie de los gametos que permiten una fecundación específica para cada especie. La reacción acrosomal puede ocurrir antes o después de la fijación de la cabeza espermática a la zona pelúcida pero para la fijación es esencial que el gameto masculino tenga el acrosoma intacto. (Hafez 2002)

#### **2.1.3.1.3. Fusión de gametos.**

La fertilización consiste en la activación del ovulo por el espermatozoide, y sin este estímulo, el ovocito de la especie bovina sería incapaz de formar pronúcleos y convertirse en cigoto. (Gordon 2003)

Antes y después que la célula espermática toma contacto con la zona pelúcida se desencadena la reacción acrosómica. Durante la reacción se funden dos tercios de la membrana plasmática con la membrana externa del acrosoma formando vesículas, de esta forma se liberan las enzimas acrosomales. Esas enzimas líticas abren el camino al espermatozoide a través de la zona pelúcida. (Palma et al. 1993)

#### **2.1.3.1.4. Formación de los pronúcleos.**

Al penetrar el espermatozoide la zona pelúcida, el ovulo completa la meiosis y expulsa el segundo corpúsculo polar en el espacio perivitelino. Los cromosomas haploides maternos son rodeados entonces por un pronúcleo. Los pronúcleos masculino y femenino emigran al centro del óvulo para nuevos arreglos en el armazón citoesquelético del óvulo después de la fecundación. (Hafez 2002)

### **2.1.3.2. Fecundación in vitro de ovocitos madurados.**

Es el fenómeno o proceso a través del cual el espermatozoide o célula masculina es capaz de unirse y penetrar la célula femenina u ovulo para formar un nuevo individuo bajo condiciones de laboratorio. (Fernández 2004)

#### **2.1.3.2.1. Preparación del espermatozoide para la fertilización in vitro.**

De la misma forma que el ovocito, los espermatozoides llevan a cabo con la capacitación su maduración, que in vivo se desencadena a través de las secreciones del tracto genital femenino. La capacitación conduce a cambios en la composición lipoprotéica de la membrana espermática, a un aumento del metabolismo y de la motilidad del espermatozoide. (Revisado por Gordon 2003)

Se ha demostrado que el uso de la heparina, mejora los resultados de fertilización in vitro. El origen cervical y uterino de la heparina fue el punto de partida para concluir que su presencia juega un rol de importancia en la preparación de los espermatozoides para la fecundación. Hoy se sabe que la heparina a través de la reacción acrosómica permite el ingreso del espermatozoide en el ovocito. (Palma et al. 1993)

#### **2.1.3.2.2. Concentración espermática en el medio de fertilización.**

La fecundación in vitro en la especie bovina se puede llevar a cabo con semen fresco o congelado/descongelado después que es llevado a cabo el swim-up. Este tratamiento permite establecer condiciones similares a las fisiológicas. El semen a tratar es colocado en el fondo de un tubo cónico conteniendo 1 ml de medio de capacitación y sometido a baño María a 39°C durante 1h. En la actualidad se conoce que durante este tiempo la capacitación sólo se inicia. El proceso concluye en el medio de fecundación durante el co-cultivo de los espermatozoides con los ovocitos. Durante el swim-up los espermatozoides motiles migran en el medio de capacitación, liberándose del plasma seminal que queda en el fondo del tubo cónico. Después de 60 minutos de incubación se retira 850µl del sobrenadante con los espermatozoides motiles y centrifugado a 200 g durante 10 minutos. Después de la centrifugación el sobrenadante es retirado y el "pellet" resuspendido. Después de una segunda centrifugación se retira el sobrenadante hasta un volumen de 100µl y se evalúa la

concentración espermática a fin de colocar una concentración de 1 millón de espermatozoides por ml de medio donde se encuentran los ovocitos. (Palma et al. 1993)

#### **2.1.4. La GnRH y la LH en la reproducción.**

La actividad de los ovarios está regulada por la interacción de mecanismos endocrinos sistémicos y factores locales (paracrinosis y autocrinos). Los folículos se desarrollan hasta el estadio antral sin requerir de las hormonas gonadotróficas. Es decir, que la activación inicial de folículos primordiales es gonadotrófica independiente y comienza en la vida fetal. (Gigli y col. 2006)

Tras un estímulo del SNC, las neuronas endocrinas del hipotálamo producen la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta es transportada vía el sistema porta hipotálamo-hipofisario al lóbulo anterior de la hipófisis, su órgano diana. Aquí estimula a células específicas de la hipófisis para que secreten las hormonas folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). (Ptaszynska, 2007)

##### **2.1.4.1. Hormonas que participan en el desarrollo folicular:**

###### **2.1.4.1.1. Hormona liberadora de gonadotropinas**

**(GnRH):** El hipotálamo es el órgano encargado de convertir las señales neurológicas originadas en estímulos externos e internos en descargas hormonales. Uno de sus productos es la hormona GnRH. Luego de ser secretada es

acumulada en la eminencia media hasta que se produce la despolarización neuronal. Como respuesta al estímulo adecuado, la GnRH entra a capilares fenestrados y llega a la hipófisis vía vasos portales. Según los pulsos liberados se secreta como respuesta FSH o LH. (Gigli y col. 2006)

**2.1.4.1.2. Hormona folículo estimulante (FSH):** La FSH es necesaria para el reclutamiento de folículos antrales. Las células de la teca interna de los folículos terciarios responden al estímulo de la FSH produciendo andrógenos y estimulando la activación de la enzima aromatasa en las células de la granulosa y transformando a los andrógenos en estradiol. La FSH también está involucrada en el aumento de la vascularización del folículo dominante. El aumento de la irrigación permite una mayor obtención de nutrientes permitiendo el desarrollo de los folículos ováricos. Bajo la influencia de la FSH, las células de la granulosa se dividen por mitosis incrementando las capas que rodean al ovocito I y aumentando el tamaño folicular. La FSH junto con el estradiol estimula la formación de la cavidad antral y la expresión de receptores para LH en las células de la

granulosa del folículo preovulatorio. La FSH también cumple un rol en el proceso de ovulación al estimular la secreción del activador del plasminógeno por parte de las células de la granulosa. (Gigli y col. 2006)

**2.1.4.1.3. Hormona luteinizante (LH):** La función de la LH es reiniciar la meiosis en el folículo preovulatorio, desencadenar la ovulación y controlar el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo (CL). Ejerce su acción uniéndose a receptores de membrana en las células de la granulosa y teca del folículo preovulatorio. (Gigli y col. 2006)

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

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

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

### **2.1.5.1. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)**

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

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

### **2.1.5.2. Hormona luteinizante (LH)**

La hormona luteinizante mejora la maduración de los ovocitos inmaduros obtenidos de animales sacrificados esto se refleja en las elevadas proporciones de ovocitos fertilizados. (Zuelke y Brackett, 1990)

Si bien pueden madurar ovocitos in vitro de forma espontánea o adicionando otras hormonas, la adición de LH al medio de cultivo aumenta en 3 veces el número de ovocitos maduros de rata. (Shalgi 1979)

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

## **2.1.6. Cultivo in vitro de ovocitos fecundados.**

### **2.1.6.1. Desarrollo embrionario bovino.**

Después de la fusión de gametos, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas sin aumento de masa celular, proceso denominado segmentación, a la vez que va recorriendo el oviducto hacia el útero. (Hafez 2002)

Los cigotos sufren la primera división celular aproximadamente a las 17-19h tras la ovulación. Los embriones mantienen el estadio de 2 células durante 6-8h mientras que el estadio de 4 células se prolonga durante 20-24h. Las segmentaciones son siempre mitóticas y por ello cada célula hija o blastómero recibe el juego completo de cromosomas. (Hafez 2002)

### **2.1.6.2. Primeros estadios del desarrollo embrionario.**

#### **2.1.6.2.1. Formación de la mórula.**

Una vez que el embrión ha formado (8-16 células) se denomina mórula esto alrededor del día 4, tomando como día 0 el momento de la ovulación. En este momento los blastómeros se aplanan entre sí para formar un embrión redondo y los componentes celulares internos se disponen asimétricamente produciéndose la compactación de los blastómeros. (Hafez 2002)

#### **2.1.6.2.2. Formación del blastocisto.**

Cuando la mórula está formada, las blastómeras empiezan a separarse en 2 poblaciones distintas: las células internas y las externas. Los fluidos empiezan a acumularse en el interior del embrión. Este acúmulo de fluido se debe a la acción de la bomba de sodio y potasio, la cual introduce iones al interior de la mórula; al aumentar la concentración de éstos, el agua difunde hacia el interior y comienza a formarse la cavidad o blastocele en la masa de células. (Hafez, 2002).

Esta etapa recibe el nombre de blastocisto y en él se diferencian dos tipos de células diferentes, los de la masa celular interna (MCI) y las células del trofoblasto. Las células del trofoblasto dan lugar a los tejidos fetales de la placenta y las membranas extraembrionarias, mientras que la MCI se desarrolla en las tres capas germinales del embrión. (Gordon 2003)

#### **2.1.6.3. Cultivo in vitro de embriones.**

Aquellos embriones de 4 o más células resultantes de la FIV son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo embrionario donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta

llegar a mórulas y blastocistos. Al llegar a estos estadios, los embriones pueden ser transferidos a vacas receptoras (en fresco) o congelados para su posterior uso. (Fernández 2004)

La primera evaluación morfológica puede llevarse a cabo 90h después de la FIV, en ese momento se encuentran 43% de los embriones en estadio de 6-12 células. (Palma et al. 1993)

#### **2.1.6.3.1. Condiciones de cultivo.**

Los embriones obtenidos después de la fecundación son incubados a una temperatura que viene determinada por la especie animal a la que pertenecen, utilizándose generalmente la temperatura fisiológica de la especie. En el bovino se ha visto que el cultivo in vitro de embriones a 40°C disminuye significativamente el número de blastocistos con respecto al cultivo a 37-39°C.

Además de la temperatura es necesario incubar los embriones en una atmosfera rigurosamente controlada y usar una humedad máxima para prevenir la evaporación del medio. La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta 5%  $O_2$ , 90%  $N_2$ , y 5%  $CO_2$ , para el desarrollo embrionario. Estas son similares a las

registradas en el oviducto de algunas hembras mamíferas. (Mucci y col. 2006).

#### **2.1.6.3.2. Sistemas de cultivo.**

El sistema de cultivo más utilizado es el realizado en microgotas cubiertas con aceite mineral. El aceite se utiliza para evitar la evaporación del medio y la entrada de microorganismos. Los embriones también pueden ser cultivados en un tubo o placa petri con un volumen de medio determinado. En cuanto al número de embriones cultivados en un determinado volumen, muchos autores han descrito que el cultivo de los embriones en grupo en un volumen pequeño de medio puede ejercer un efecto beneficioso sobre el desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocisto. Esto podría ser debido a la interacción cooperativa entre los embriones, mediante los factores de crecimiento secretados por ellos, que actuarían de manera tanto autocrina como paracrina sobre los embriones del cultivo. (Revisado por Gordon 2003).

#### **2.1.6.3.3. Medios de cultivo.**

Dos medios de cultivo de embriones han sido ampliamente utilizados en los estudios durante los últimos diez años: por una parte, el medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-

199), un medio complejo e indefinido, y el fluido oviductal sintético (SOF) un ejemplo de un medio relativamente simple y bien definido. El complejo medio TCM-199 fue diseñado para el mantenimiento de las células somáticas in vitro en lugar del cultivo de embriones de mamíferos. Hay quienes creen que los embriones bovinos generados por el sistema SOF muestran una mayor similitud con sus contrapartes en vivo, que los generados por el medio TCM-199. También está el hecho de que el sistema SOF, puede reducir los efectos adversos del oxígeno, ya que está más acorde con el microambiente oviductal. El medio SOF se basa en un análisis bioquímico de fluidos oviductales de ovejas. En comparación con el TCM-199 co-cultivado con células de la granulosa, y el sistema SOF para aumentar el rendimiento de los blastocistos, los mejores resultados se obtuvieron con SOF. La transferencia de cigotos al medio SOF inmediatamente después de la fecundación in vitro aceleró el desarrollo del embrión, con un alto porcentaje de embriones que eclosionaron hasta el día 7. (Gordon 2003)

#### **2.1.6.3.4. Co-cultivos celulares.**

Desde que se comprobó que los cigotos ovinos se desarrollaban hasta blastocisto cuando eran co-cultivados con células epiteliales de oviductos ovinos, mientras que los cultivados sin células no progresaban más allá de las 16 células, muchos estudios han utilizado el sistema de co-cultivo con células somáticas. Diversos autores también han indicado que los embriones bovinos, cuando son cultivados en un medio sin soporte celular, son incapaces de superar el 4º ciclo de división embrionaria, mientras que si se añaden células a los medios se obtienen altos porcentajes de desarrollo hasta blastocisto. (Palma et al. 1993)

El oviducto de la especie bovina proporciona el microambiente para la maduración final de los gametos, la fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Se ha observado que los embriones cultivados in vitro con células del epitelio oviductal se desarrollan de manera similar a los desarrollados in vivo. Esto sugiere que las células del epitelio oviductal pueden producir componentes estimuladores del crecimiento embrionario. (Gordon 2003)

### **2.1.7. Diferencias entre los embriones producidos in vivo e in vitro.**

Los embriones bovinos producidos in vitro son de menor calidad que los producidos in vivo diferenciándose en que presentan un citoplasma más oscuro, una menor densidad de flotación, una zona pelucida más frágil, mayores tasas de abortos y pérdida de la gestación. (Gordon 2004, Herradon y col. 2007)

Embriones vacunos producidos in vitro tienen un desarrollo retardado y que frecuentemente muestran un grado reducido de compactación antes de la formación del blastocisto que sus homólogos in vivo. (Gordon 2004)

Todo ello determina una reducción de su potencial de desarrollo ocasionando bajos porcentajes de gestación y una escasa resistencia a la criopreservación, dificultando su conservación a largo plazo. (Herradon y col. 2007)

Aunque la tasa de maduración y fertilización in vitro son altas (90-80%) la tasa de desarrollo de blastocisto es baja (30%) (Mucci y col. 2006)

Esto indica que el cultivo embrionario desde cigoto hasta blastocisto es crítico debido a las condiciones subóptimas de cultivo (Ahuja y col. 2009)

## **2.2. Antecedentes de la investigación:**

### **“fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem”**

En el experimento realizado en Venezuela utilizaron 0,8  $\mu$ /ml de GnRH en el medio TCM-199 suplementada con 10% de suero fetal bovino y gonadotropina coriónica humana, lograron una tasa de maduración de ovocitos del 75% comparado al experimento control sin GnRH en el cual lograron el 64%. (Fernández y col. 1997)

### **“Obtención de embriones por maduración y fertilización in vitro de oocitos bovinos”**

Según el trabajo realizado en La Paz, Bolivia en el año 2001, sobre la maduración y fertilización de ovocitos a partir de ovarios recolectados del matadero, procedentes del altiplano de La Paz y los llanos del Beni. Para el presente estudio se usaron solamente los ovocitos con calidad morfológica I y II. Fueron cultivados en un medio que contenía 100 $\mu$ L de TCM-199 suplementada con 15% de suero de vaca en estro, 0,5 $\mu$ g/ml de FSH, 0,5 $\mu$ g/ml de LH, 10 $\mu$ L/ml de piruvato de sodio y 187 $\mu$ L/ml de lactato de sodio. Obtuvieron para las vacas del Beni un 36% de ovocitos en metafase II, significativamente mayor al 24% de ovocitos maduros de vacas de La Paz. (Rea y col. 2001).

### **Efecto de las gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos cultivados in vitro.**

En el presente estudio realizado en Montería, Colombia, se evaluó el efecto de las hormonas FSH y LH sobre la maduración y fertilización in vitro de ovocitos bovinos, donde el medio base fue TCM-199 suplementado con FSH y LH. Demostraron que la FSH o LH sola o en combinación inducen altas tasas de maduración de ovocitos bovinos in vitro ya que en ausencia de las gonadotropinas solo el 36,43%

alcanzo la maduración nuclear lo cual indica la importancia de estas hormonas para una adecuada maduración. En este estudio se demostró que las mayores tasas de maduración in vitro fueron alcanzados cuando el medio de maduración contenía una mayor proporción de LH 150µg/ml y 50µg/ml de FSH (Salgado y col. 2010)

**The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro.**

Para evaluar el efecto de la adición de 10µg/ml de LH en la maduración in vitro de ovocitos de rata en Israel. Se logro una maduración del 80% en ovocitos madurados con LH en comparación con el 37% de ovocitos cultivados sin LH. Los porcentajes de fertilización fueron del 43% y 14% respectivamente. Por cuanto concluyeron que la maduración de los ovocitos en presencia de LH permite la penetración de los espermatozoides y mejora la fertilización de los ovocitos (Shalgi et al 1979)

**Luteinizing hormone enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation.**

En el presente estudio realizado en Grecia, se ha demostrado que la hormona luteinizante mejora la maduración de ovocitos obtenidos de animales sacrificados y cual se vio reflejado en la elevada proporción de ovocitos madurados y fertilizados. El efecto positivo de la LH se verifico durante la maduración in vitro de ovocitos bovinos (37,5% en TCM-199 vs 73,5% en TCM-199 + LH) con respecto a los niveles de LH obtuvieron mejores resultados cuando se adicionaron 50 y 100µg /ml en el medio de cultivo. (Zuelke y Braccket 1990)

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS:**

#### **3.1. Localización de la investigación.**

El presente estudio de investigación se realizó en la región de Puno se encuentra ubicada en la sierra del sudeste del país en la Meseta del Collao y a orillas del Lago Titicaca a una altitud de 3827 m.s.n.m. Tiene un área o superficie de 71 999 km<sup>2</sup> dividida en 13 provincias y 109 distritos, la temperatura Anual: Máxima de 18,8° C (Noviembre), Mínima de -8,2° C (Julio).

El trabajo se realizó durante los meses de noviembre del 2010 a septiembre del 2011. Los ovarios se colectaron en el camal municipal de Juliaca. Los ovocitos fueron recuperados y posteriormente madurados y fertilizados in vitro en el laboratorio de cultivos celulares de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano en Puno.

#### **3.2. Materiales.**

##### **3.2.1. Materiales para maduración in vitro:**

###### **3.2.1.1. Materiales biológicos:**

- Ovarios de vacas beneficiadas

###### **3.2.1.2. Materiales de laboratorio:**

- Placas Petri de 35mm
- Placas petri de 90mm.
- Tubos de ensayo de 10 y 15ml
- Matraz de 500 y 1000ml
- Vaso de precipitación de 100 y 250ml
- Micro pipeta de inoculación
- Plastic tips
- Termómetro

- Jeringas de 20ml
- Agujas desechables 18G
- Tijera de mayo
- Mandil blanco
- Guantes desechables
- Mascarillas
- Termo de boca ancha

### **3.2.1.3. Medios de cultivos e insumos**

- Agua destilada
- Suero fetal bovino
- Glucosa
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (cloruro de calcio dihidratado)
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (sulfato de magnesio heptahidratado)
- NaCl (cloruro de sodio)
- KCl (cloruro de potasio)
- $Na_2HPO_4$  (fosfato de sodio)
- $KH_2PO_4$  (fosfato de potasio)
- BSA (albumina sérica bovina)
- Medio de cultivo TCM-199
- PBS fosfato buffer salino
- FSH (hormona folículo estimulante)
- 17- $\beta$ -estradiol
- LH (hormona luteinizante)
- GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas)
- Sulfato de gentamicina.

**3.2.1.4. Equipos:**

- Agitador magnético
- vortex
- Incubadora con CO<sub>2</sub>
- Cámara de flujo laminar
- Baño María de flotación
- Placa calefactora
- Balanza analítica
- Estufa esterilizadora
- Estereomicroscopio de investigación
- Microscopio invertido con contraste de fases
- Refrigeradora
- Cámara fotográfica

**3.2.2. Materiales para fertilización in vitro:**

El equipo empleado para la fertilización in vitro de ovocitos fue el mismo que se empleo para la maduración in vitro, salvo el siguiente: Para conservar las pajillas de semen congelado se dispuso de un tanque de nitrógeno líquido de 3kg.

**3.2.3. Materiales para cultivo de embriones:**

El equipo empleado para el cultivo de embriones es el mismo que se empleo para la maduración in vitro.

Los materiales de laboratorio se lavaron con Dodigen e hidróxido de sodio (detergentes ionicos), se enjuagaron con agua destilada y fueron secados en estufa a 60°C. Las manipulaciones que exigen condiciones de esterilidad como la preparación y filtrado de los medios de cultivo se realizaron en la cámara de flujo laminar provista de luz ultravioleta.

El almacenamiento y conservación de los medios de cultivo se realizó en tubos de cristal debidamente identificados en refrigeración.

### 3.2.4. Medios de cultivo y composición:

#### 3.2.4.1. Medio de transporte y lavado de los ovarios:

El medio utilizado para la recuperación, lavado y transporte de los ovarios desde el matadero hasta el laboratorio. Se utilizó la solución salina fisiológica fosfato buffer salino (PBS). El medio se conserva a 5°C durante un tiempo máximo de 7 días.

Tabla 1: Medio de transporte y lavado de ovocitos

Agente	Cantidad
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ * (cloruro de calcio)	0,132g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ * (sulfato de magnesio)	0,121g
NaCl (cloruro de sodio)	8,0g
KCl (cloruro de potasio)	0,2g
$Na_2HPO_4$ (fosfato de sodio)	1,15g
$KH_2PO_4$ (fosfato de potasio)	0,2g
Glucosa	1,0g
Piruvato de sodio	0,036g
Sulfato de estreptomicina	0,05g
Penicilina G sodica	100 000UI

*Fuente: Hafez 2002*

*\*pesar separadamente*

#### 3.2.4.2. Medio de lavado de ovocitos:

Para la recolección, lavado y manipulación de los ovocitos, se utilizó la misma solución anterior suplementado con 1% de albumina sérica bovina.

#### 3.2.4.3. Medio de maduración de ovocitos:

Se utilizó el medio TCM-199. Una vez preparado se procedió a su filtración y se conservó refrigerado a 5°C

hasta el momento de su uso. En el momento de su utilización, el TCM-199 se suplemento con LH o GnRH según el tratamiento.

Tabla 2: Medio de maduración

Agente	Para preparar 10ml
TCM-199	9ml
Suero fetal bovino (SFB)	0,9ml
17- $\beta$ estradiol	200 $\mu$ l
Glucosa	10mg
Gentamicina	156 $\mu$ l

Fuente: Elaboración propia

#### 3.2.4.4. Medio de capacitación y fecundación:

Tabla 3: Medio de capacitación y fecundación

Agente	Para 10ml
TCM-199	9ml
Suero fetal bovino (SFB)	0,9ml
Gentamicina	156 $\mu$ l

Fuente: Elaboración propia

#### 3.2.4.5. Medio de cultivo de embriones:

Tabla 4: Medio de cultivo de embriones

Agente	Para 10ml
TCM-199	9ml
Albumina sérica bovina (BSA)	0,9ml
Gentamicina	156 $\mu$ l

Fuente: Elaboración propia.

### **3.3. Métodos:**

#### **3.3.1. Método para maduración in vitro:**

##### **3.3.1.1. Colección de ovarios:**

Los ovarios fueron colectados en el camal municipal de Juliaca a partir de vacas y vaquillas de la raza Brown swiss sin tomar en cuenta las condiciones físicas y las edades de las mismas. Los ovarios se separaron con tijera mayo del tracto reproductivo inmediatamente después de que los órganos internos fueran extraídos de la canal, se lavaron con solución salina fisiológica (PBS) temperada y se guardaron en un termo el mismo que contenía 300ml de medio de transporte a una temperatura de 38°C adicionado con 50µg/ml de gentamicina. Posteriormente fueron transportados al Laboratorio de cultivos celulares de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, en un tiempo no superior a las 6 horas posteriores al sacrificio de los animales.

En el laboratorio, los ovarios fueron lavados nuevamente en solución fisiológica (PBS) temperada a 38 °C para desprender residuos de tejidos de manera que sean completamente visibles los folículos ováricos.

##### **3.3.1.2. Recuperación de ovocitos:**

Los ovarios se extrajeron individualmente de la solución salina y secados con papel toalla. Los ovocitos fueron colectados por el método de aspiración directa de todos los folículos visibles por medio de una aguja

hipodérmica estéril de calibre 18 G acoplado a una jeringa desechable de 20ml el cual contenía 1ml Solución Buffer Fosfato Salino (PBS) suplementado con 1% de albumina sérica bovina a 38 °C. El contenido de la aspiración (líquido folicular y ovocitos) fue depositado en una placa petri de 90mm, el cual se dejó sedimentar por 15 minutos manteniéndolo en todo momento a 38 °C sobre la placa calefactora.

### **3.3.1.3. Clasificación y selección de los complejos cumulus ovocitos:**

Para proceder a la selección y clasificación de los complejos cumulus ovocitos se retiró el sobrenadante y seguidamente los ovocitos se cambian de la primera placa a otra que contiene 5ml de medio de lavado se repite este procedimiento 2 veces más con el fin eliminar las impurezas que llevan adheridos los ovocitos antes de ser seleccionados y colocados en medio de maduración, se procedió a la búsqueda y clasificación morfológica de los ovocitos en cuatro categorías por medio de un estereomicroscopio (LEICA) con un aumento de 30X. La clasificación morfológica de los ovocitos, se realizó siguiendo el método efectuado por Leibfried y First en 1979.

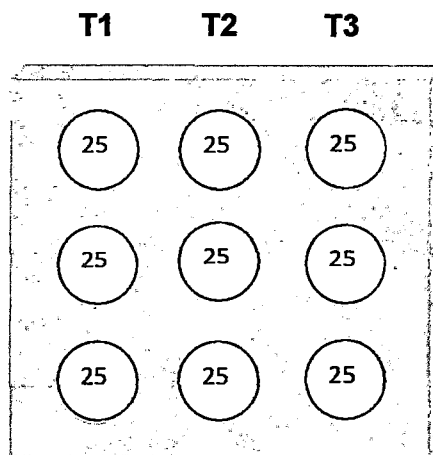
Tabla 5: descripción morfológica de ovocitos bovinos

CATEGORÍA	DESCRIPCIÓN DE LA CATEGORÍA
Categoría I	Ovocitos con envoltura completa, cumulus oophorus presente, con más de tres capas compactas, espesas, brillantes y transparentes; ovoplasma homogéneo y completo dentro de la zona pelucida.
Categoría II	Ovocitos con tres capas de células cumulares compactas y espesas o cubiertas parcialmente; ovoplasmas homogéneos con zonas oscuras dentro de la zona pelucida.
Categoría III	Cubiertas celulares expandidas, dispersas en una matriz oscura, cumulus celular aparece amontonado y en diferentes lugares; con ovoplasmas irregulares
Categoría IV	Con residuos de células cumulares o totalmente desnudos, rodeados solo por la zona pelucida; con ovoplasmas regulares o irregulares, degenerado, vacuolizado, fragmentado, zona pelucida vacía.

*Fuente: liebfried y first. (1979)*

#### **3.3.1.4. Maduración in vitro de ovocitos:**

Para la maduración in vitro de ovocitos se colocó a madurar 25 ovocitos en gotas de maduración de 250µl, se preparó 3 tratamientos con 3 repeticiones cada una, por lo que se preparo 9 gotas de maduración, haciendo un total de 225 ovocitos.



Para todos los tratamientos los ovocitos fueron incubados a 38,5 °C, CO<sub>2</sub> al 5%, y alta humedad durante un periodo de 24 horas.

**Experimento: Efecto de la GnRH y la LH en la maduración in vitro de ovocitos bovinos.**

Para evaluar el efecto de la LH (10µg/ml) y GnRH (0,8µg/ml) en maduración in vitro, los ovocitos se cultivaron en ausencia (grupo control) o en presencia de LH o GnRH conforme a los siguientes tratamientos.

Tratamiento 1: TCM - 199

Tratamiento 2: TCM - 199 + GnRH

Tratamiento 3: TCM - 199 + LH

De esta manera se colocaron a madurar un total de 225 ovocitos distribuidos de la siguiente manera 75 ovocitos con el tratamiento 1; 75 ovocitos con el tratamiento 2 y 75 ovocitos con el tratamiento 3.

### **3.3.2. Método para fertilización in vitro:**

#### **3.3.2.1. Preparación del semen:**

En el transcurso de la preparación de los espermatozoides se evitó en lo posible los cambios bruscos de temperatura por tanto todo el material que entro en contacto con los espermatozoides se mantuvo a 38°C.

##### **3.3.2.1.1. Descongelado del semen:**

La pajilla de semen se descongeló a 38°C durante 30 segundos en baño maría. Posteriormente se cortaron los extremos de la pajilla y el semen se deposito en un tubo de ensayo de 10ml estéril previamente temperado a 38°C. Se tomo una muestra y se comprobó la motilidad de los espermatozoides, en el microscopio, el cual fue superior al 70%.

##### **3.3.2.1.2. Separación de la fracción móvil:**

En un tubo de ensayo de 10ml se deposito 1ml de TCM-199 y se mantuvo en la incubadora a 38,5°C durante 1 hora, posteriormente se introdujo en el tubo de ensayo todo el contenido de la pajilla de semen. Seguidamente el tubo de ensayo se llevo a la incubadora donde se mantuvo a una inclinación de 45°C durante una hora. Pasado una hora se aspiró 0,5ml del sobrenadante el cual se deposito en otro

tubo de ensayo que contenía 0,5ml de TCM-199 previamente temperado.

### **3.3.2.2. Preparación de los ovocitos:**

Después de las 24 horas de maduración in vitro, se procedió a la eliminación de las células del cumulus mediante agitación en vortex durante 1 minuto. Los ovocitos de cada grupo se lavan independientemente en un medio que contiene 0,5ml de TCM-199 y 0,5ml de PBS.

### **3.3.2.3. Condiciones de inseminación:**

La fecundación in vitro se realizó en microgotas de 50 $\mu$ l en placas petri de 6 pocillos. Las microgotas se cubren totalmente con parafina líquida y se equilibran temperatura y gases en la incubadora dos horas antes de iniciar la fertilización in vitro. En cada microgota se colocó 25 ovocitos. A cada gota se agregó de 10 $\mu$ l de semen. Ovocitos y espermatozoides se mantuvieron juntos, en la incubadora durante 24 horas a 38,5°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> y alta humedad en el aire.

### **3.3.2.4. Prueba de fertilización in vitro:**

**Experimento: Efecto de la GnRH y la LH en la fertilización in vitro de ovocitos bovinos.**

Para evaluar el efecto de la GnRH y la LH en la fertilización in vitro los ovocitos madurados se fecundaron in vitro bajo idénticas condiciones.

Los tratamientos empleados en la maduración in vitro son:

Tratamiento 1: TCM - 199

Tratamiento 2: TCM - 199 + GnRH

Tratamiento 3: TCM - 199 + LH

### **3.3.3. Método para cultivo de embriones:**

#### **3.3.3.1. Preparación de los ovocitos fecundados:**

Después de las 24 horas de fertilización in vitro, se procedió a la eliminación de los espermatozoides adheridos a los ovocitos mediante lavados en un medio que contiene 0,5ml de TCM-199 y 0,5ml de PBS.

#### **3.3.3.2. Cultivo de embriones:**

**Experimento: Efecto de la GnRH y la LH en el cultivo in vitro de ovocitos bovinos.**

Luego de ese periodo, se evaluó todos los ovocitos para verificar el desarrollo embrionario.

### **3.4. Valoración de resultados:**

#### **3.4.1. Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos**

Para evaluar la maduración in vitro de ovocitos se le retiraron las células del cumulus y fueron examinados en un microscopio de contraste de fases a un aumento de 100X. Se considero que un ovocito está maduro cuando se observó el 1º corpúsculo polar formado, es decir, cuando el ovocito se encuentre en el estadio de metafase II.

#### **3.4.2. Evaluación de la fertilización in vitro**

La fecundación de los ovocitos tras 24 horas de co-cultivo con los espermatozoides, será valorada con la recogida de una

muestra de ovocitos de todas las gotas de fecundación, 25 ovocitos por experiencia. Estos serán clasificados como:

- a. Normalmente fecundados: cuando en el citoplasma del cigoto se observe 2 pronucleos, uno masculino y otro femenino, y una cola de espermatozoide, o bien, una cabeza de espermatozoide descondensándose acompañada de su cola y de un pronucleo femenino.
- b. Poliespérmicos: ovocitos penetrados por más de un espermatozoide.

### **3.4.3. Evaluación del desarrollo embrionario**

Tras 7 días de cultivo todos los presuntos embriones serán examinados en un microscopio de contraste de fases con un objetivo de 100x y se clasificarán en 3 grupos:

- Embriones de 2 a 34 células
- Mórulas: embriones con más de 34 células en los que no se observe ninguna cavidad en su interior.
- Blastocistos: embriones con más de 69 células en los que se apreciara la formación del blastocele.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

##### 4.1. Recuperación de ovocitos:

Con el fin de adiestrarnos en la punción y aspiración folicular y conocer el número y la calidad morfológica de los ovocitos bovinos se realizaron varios ensayos preliminares antes de comenzar con el experimento de maduración y fertilización in vitro.

Tabla 6: Ovarios aspirados y ovocitos recuperados

Día	Nº de ovarios	Ovocitos recuperados	Calidad morfológica				Nº ovocitos / ovario
			I	II	III	IV	
1	34	210	44	53	72	41	6,18
2	26	155	25	43	57	30	5,96
3	28	141	20	34	51	36	5,04
4	32	208	30	46	80	52	6,50
5	34	244	44	69	82	49	7,18
6	44	309	70	94	99	46	7,02
total	198	1267	233	339	441	254	6,31

Fuente: Elaboración propia (2011).

Como se muestra en la tabla N° 6 y 7 se recuperaron 1267 ovocitos mediante aspiración de los folículos de 198 ovarios lo que produjo una cifra media de 6,31 ovocitos por ovario, estos ovocitos fueron clasificados en cuatro categorías según la morfología de sus citoplasmas y el cumulus celular que los rodean.

Tabla 7: Porcentaje de recuperación de ovocitos

Nº ovarios	Nº ovocitos recuperados	Calidad de ovocitos	Nº	%
198	1267	Calidad I	233	18,39%
		Calidad II	339	26,75%
		Calidad III	441	34,80%
		Calidad IV	254	20,05%
total			1267	100%

Fuente: Elaboración propia (2011).

De todos los ovocitos recuperados, se seleccionaron como aptos para la maduración in vitro, los ovocitos con calidad morfológica I y II. (Anexo 1 y 2) Para la calidad I (tabla 7) se obtuvo un 18,38% del total de ovocitos recuperados, para la calidad II el 24,38%. El resto de ovocitos recogidos, el 54,85%, lo componían ovocitos con cumulus celular incompleto o degenerado y ovocitos con signos degenerativos en el citoplasma, zona pelucida rota o sin contenido citoplasmático (Anexo 3 y 4). Estos ovocitos fueron descartados.

Tabla N° 8: Resumen de recuperación de ovocitos

N° de ovocitos seleccionados	572 (45,15%)
N° de ovocitos / ováριο	6,31
N° de ovóцитos / vaca	12,62
N° de ovóцитos / ováριο (I y II)	2,89

Fuente: Elaboración propia 2011.

Como se observa en la tabla 08 el número de ovocitos obtenidos por vaca fue de 12,62. Este resultado está de acuerdo con los valores encontrados por Rea y col. ( 2001) quienes obtuvieron 12,1 ovocitos por vaca, el resultado también es ligeramente inferior al indicado por Gordon ( 2003) quien indica que se obtiene una media de 14,3 ovocitos por vaca y 15 ovocitos por vaca obtenido por Palma y col. (1993). Esta similitud de resultados probablemente se deban, a la elección del método de aspiración porque se considero, como factor muy importante, la rapidez en la obtención de ovocitos, al uso de agujas de 18G empleadas por nosotros y muchos autores como Salgado y col. (2010), Ahuja y col. ( 2009), Fernández y col. ( 2007),

Villarreal ( 2005) y Larocca y col. ( 1998) y también a la habilidad del trabajador en el laboratorio.

En nuestro trabajo se utilizaron para la maduración in vitro solamente los ovocitos con calidad morfológica I y II atendiendo principalmente al aspecto del citoplasma, así como al número de capas celulares del cumulus oophorus que rodean al ovocito. Según Moor ( 1983) La presencia de las células del cumulus favorece el desarrollo de los ovocitos inmaduros ya que facilitan la asimilación de aminoácidos y de otros nutrientes que en forma pasiva no atraviesan la zona pelucida. Los resultados obtenidos por varios grupos de trabajo indican que solo los ovocitos que cuentan con un cumulus celular completo y compacto poseen una mayor capacidad para completar la maduración in vitro. Palma y col. ( 1993), López ( 1996) y Gordon ( 2004) ya que estas llevan a cabo funciones nutritivas y reguladoras. Ahuja y col. ( 2009)

#### **4.2. Tamaño de los ovocitos**

Con el fin evaluar la viabilidad de los ovocitos seleccionados para la maduración y fertilización in vitro se realizó la medición de algunos ovocitos. Solamente los ovocitos mayores a 110 $\mu$ m fueron considerados aptos para la maduración. (Anexo 2)

Los resultados del tamaño de ovocitos al comienzo de la maduración in vitro de ovocitos de calidad morfológica I y II, quedan reflejados en la tabla 9, como se observa en dicha tabla el 100% de ovocitos tienen medidas superiores a los 110 $\mu$ m por lo que son capaces de alcanzar la maduración nuclear y citoplasmática.

Tabla 9: Medidas de ovocitos en micras ( $\mu\text{m}$ )

Nº ovocito	Zona pelucida	Ovocito sin ZP*	Ovocito + ZP*
1	14,5	112,24	126,74
2	14,13	113,68	127,81
3	22,1	122,43	144,53
4	10,37	150,00	160,37
5	17,93	153,21	171,14
6	13,26	156,93	170,19
7	10,92	164,17	175,09
8	10,92	168,92	179,84
9	9,18	186,15	195,33
10	10,40	130,55	140,95
11	9,72	150,83	160,55
12	13,20	135,15	148,35
promedio	13,30	146,28	161,16

Fuente: Elaboración propia. 2011

\*ZP zona pelucida

Por tanto los ovocitos utilizados para la maduración in vitro, en una muestra de 12 ovocitos de calidad I y II, tenían un promedio de 146,28 $\mu\text{m}$ , siendo el ovocito de menor tamaño de 112,24 $\mu\text{m}$  esta medida es de mucha importancia ya que según Gordon (2003) indica que solo los ovocitos con un diámetro mayor a los 110 $\mu\text{m}$  son capaces de alcanzar gradualmente la competencia para someterse a la maduración meiótica y sostener el desarrollo embrionario. Mientras que Chaves y col. (2010) sostiene que los ovocitos de 115 $\mu\text{m}$  son capaces de alcanzar la maduración nuclear más para adquirir la capacidad de desarrollo embrionario deben estar con un diámetro superior a 120 $\mu\text{m}$ . por tanto los mejores indicadores de la viabilidad de un ovocito son un tamaño grande, un citoplasma homogéneo y la

presencia de las células del cumulus rodeando al ovocito (Zuelke y Brackett 1990)

#### 4.3. Maduración de ovocitos in vitro:

Experimento: Efecto de la GnRH y la LH en la maduración in vitro de ovocitos bovinos.

Tabla 10: Ovocitos recolectados en el día del experimento.

Nº de ovarios	Ovocitos recuperados	Calidad morfológica				Nº ovocitos / ovario
		I	II	III	IV	
50	444	98	142	123	81	8,88

Fuente: Elaboración propia 2011.

De todos los ovocitos recuperados se seleccionaron como aptos para la maduración y fertilización in vitro los ovocitos de la categoría I y II haciendo un total de 240 (54,05%) el resto de ovocitos recogidos 204 (45,95%) fueron descartados. Los resultados obtenidos después de 24 horas de maduración in vitro de ovocitos bovinos, se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Número y porcentaje de ovocitos madurados in vitro.

Nº ovocitos	Ovocitos maduros	%	No madurados	% de no madurados
Control n=75	3	4,0%	72	96%
GnRH n=75	15	20,0%	60	80%
LH n=75	21	28,0%	54	72%

Fuente: Elaboración propia 2011.

Los porcentajes de maduración mostradas (tabla 11) corresponden a todos los ovocitos que muestran el primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino después de 24 horas de maduración in vitro.

Nuestros resultados son inferiores a los reportados por otros autores que para el caso del tratamiento 2 (TCM-199 + GnRH) mientras que nosotros obtuvimos un 20% de maduración Fernández ( 1997) reporta un 75% de ovocitos maduros de la misma forma sucedió con el tratamiento 3 (TCM-199 + LH) nuestro resultado fue de 28% de ovocitos maduros un resultado inferior a lo encontrado por Salgado y col. ( 2010), Ahuja y col. (2009), Villarreal ( 2005), Zuelke ( 1990) quienes suplementando con LH al medio de maduración obtuvieron 92,4%, 89,7%, 86,8%, 73,5% de ovocitos maduros respectivamente. Las diferencias en los porcentajes de maduración no solo se presento en los grupos o tratamientos suplementados con hormonas sino también para el caso del tratamiento 1 (sin hormonas) mientras que nosotros encontramos un 4% de ovocitos maduros, Fernández ( 1997) y Salgado y col. ( 2010) utilizando un medio de maduración similar al nuestro reportan un 64% y 36,43% de ovocitos maduros respectivamente.

Sin embargo nuestros resultados 20% y 28%, respecto a la maduración in vitro de ovocitos, son similares a lo reportado por Rea y col. ( 2001) quienes utilizando como medio de maduración el TCM-199 suplementado con suero de vaca en estro, estradiol, FSH, LH, piruvato y lactato de sodio obtuvieron un 24% de ovocitos maduros para las vacas de La Paz. El resultado obtenido probablemente se deba a: 1) los ovarios empleados en el presente trabajo se obtuvieron de vacas sacrificadas en el camal municipal de Juliaca sin importar las condiciones físicas ni la edad de las vacas. Según lo revisado por

Gordon ( 2003) refiere que los ovocitos procedentes de vaquillas y animales pre-púberes están relacionados con una menor capacidad de desarrollo in vitro que los procedentes de los animales adultos. Además las vacas donantes de ovocitos con los que se trabajo proceden de vacas de diferentes lugares, diferentes condiciones corporales, un hecho observado es que la mayoría de las vacas beneficiadas, en el camal de Juliaca, presentaban una condición corporal baja. Según un estudio realizado por Adamiak y col. ( 2005) indican que la condición corporal y el nivel de alimentación de la vaca donante influyen en una serie de factores que regulan el desarrollo folicular ovárico, la proliferación de las células de la granulosa y la esteroidogenesis, del mismo modo los altos niveles de alimentación también tienen un efecto perjudicial sobre la calidad de los ovocitos con bajas tasas de fertilización en ovinos y vacunos. 2) la falta de algunos componentes en el medio de maduración como el piruvato de sodio el cual fue reemplazado por glucosa como fuente de energía, según lo revisado por Picton y col. (2008) refiere que la glucosa es una fuente de energía común para casi todos los tipos de células animales, sin embargo, los ovocitos de muchas especies de mamíferos incluyendo ratones, vacas y humanos metabolizan preferentemente el piruvato y tienen poca capacidad para el metabolismo de la glucosa por tanto durante la maduración y fertilización in vitro los medios de cultivo deben complementarse con piruvato para apoyar las necesidades de energía durante la maduración del ovocito. De la misma manera Mucci y col. ( 2006) indica que los ovocitos utilizan preferentemente el piruvato y lactato como fuente de energía. 3) a las condiciones climatológicas como la temperatura del ambiente, humedad y altitud del nivel del mar. Ya que

nuestros resultados de maduración in vitro de ovocitos bovinos (20% con GnRH y 28% con LH) son similares a los encontrados por Rea y col. ( 2001) (24% para las vacas de La Paz y 36% para vacas de las llanuras del Beni) en ambos estudios se utilizaron como medio base para la maduración in vitro el TCM-199, la altitud sobre el nivel del mar también son similares entre ambas ciudades donde se realizaron los estudios (Puno 3 827 m.s.n.m. y La Paz 3 650 m.s.n.m.) de la misma forma las temperaturas ambientales también son similares (Puno con una máxima de 18°C y una mínima de -8°C; La Paz con una máxima de 18°C y una mínima de -5°C) mientras que los demás autores que reportaron mejores resultados de maduración in vitro trabajaron en ciudades donde la temperatura promedio fueron superiores a la temperatura promedio de Puno 10°C (Montería 32°C , Veracruz 23°C, Guadalajara 22°C, Caracas 28°C, Atenas 25°C e Israel 22°C)

#### **4.4. Fecundación de ovocitos madurados:**

Utilizando el TCM-199 como medio base para la fecundación in vitro no se obtuvieron ovocitos fecundados en ninguno de los tratamientos. Estos resultados no coinciden con otros autores que si observaron mejores resultados de fecundación y cultivo de embriones. Según Salgado y col. ( 2010), Ahuja y col. ( 2009), Villarreal ( 2005), Fernández y col. ( 1997) observaron 81%, 80%, 8% y 75% respectivamente.

Se puede pensar que estos resultados son como consecuencia: 1) al uso de un medio de fecundación no óptimo ya que los autores antes mencionados utilizaron el medio SPERM TALP (tyrode albumin lactate pyruvate) un medio específico para fecundación in vitro. 2) por las

influencias negativas que pueda tener la exposición a bajas temperaturas (menores a 20°C), Según lo revisado por Lorenzo ( 1992) indica que las manipulaciones de los ovocitos dentro del laboratorio aspiración de folículos, clasificación morfológica y preparación de espermatozoides deben realizarse rápidamente ya que los gametos masculino y femenino son extremadamente sensibles a los cambios bruscos de temperatura lo cual disminuye la viabilidad de los ovocitos y la capacidad de penetración del espermatozoide. 3) Las condiciones del laboratorio todavía inapropiadas donde se desarrollo el trabajo y los factores de la edad y estado nutricional de los animales.

Aunque este estudio no ha alcanzado valores de maduración y fertilización in vitro superiores al 50%, los resultados obtenidos tras la maduración in vitro de ovocitos bovinos. Si podrían utilizarse como un primer precedente sobre la maduración y fertilización de ovocitos bovinos en el sur del Perú, puesto que no existen otras referencias para comparar nuestros resultados bajo similares condiciones.

## V. CONCLUSIÓN:

- La adición de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) o la hormona luteinizante (LH) al medio maduración in vitro de ovocitos de vacas Brown swiss favorece:
  - a. La maduración del ovocito
  - b. La expansión de las células del cumulus.
- la GnRH y LH tienen un efecto positivo sobre la maduración in vitro de ovocitos ya que se observó un mayor número de ovocitos madurados en los tratamientos adicionados con estas hormonas (20% y 28%) respecto al grupo control en el cual solo el 4% de ovocitos mostraron el primer corpúsculo polar después de 24 horas de maduración in vitro.
- Los ovocitos madurados en presencia o ausencia de GnRH o LH en el medio TCM-199 no lograron ser fecundados por lo que no se observó desarrollo embrionario.

## VI. RECOMENDACIONES:

- Se recomienda realizar más estudios sobre maduración in vitro de ovocitos antes de pasar a la siguiente etapa la fecundación in vitro.
- Se recomienda realizar estudios sobre la maduración de ovocitos bovinos utilizando diferentes medios de cultivo, suplementando con diversas hormonas y otros factores de maduración con el fin de obtener un medio más óptimo para la maduración de ovocitos bovinos.
- Recomiendo realizar más estudios sobre la GnRH utilizando diferentes dosis en la maduración de ovocitos por ser esta mas económica y de fácil acceso.
- Se recomienda utilizar una estufa calefactora dentro del laboratorio con el objeto de minimizar los cambios bruscos de temperatura durante la recuperación y clasificación morfológica de los ovocitos en el laboratorio.

## VII. BIBLIOGRAFÍA:

1. ADAMIACK S.J; MACKIE K; WATT R.G; WEBB R. y SINCLAIR K.D.  
(2005) Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology of reproduction*. Vol. 73, 1355 pág.
2. AHUJA A. C. (2009) Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos, *zootecnia tropical*, Vol. 27, 1250 pág.
3. ALBERIO, R. (2003) Nuevas Biotecnologías Reproductivas. Aspectos Biológicos y Económicos, departamento de producción animal, INTA Balarse, Argentina.
4. BRACKETT B; BOUSQUET D; BOICE M; DONAWICK W; EVANS J. y DRESSEL M. (1982) Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of reproduction*. Vol. 27, 493 pág.
5. BRACKETT B. (1985) *In vitro* oocyte maturation and fertilization. *Journal animal science*. Vol. 61, pág. 14-24.
6. CORALLO N. A. 2008. Avaliação do desenvolvimento após a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Universidad De Sao Paulo, Brasil.
7. CROSBY I. M; OSBORN J. C. y MOOR R. M. (1981) Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental competence in sheep oocytes. *Journal of reproduction and fertility*. Vol. 62, 582 pág.
8. CUNNINGHAM, J. G. (2003) *Fisiología Veterinaria*, tercera edición, editorial Elsevier, España.

9. CHAVES R.N; DUARTE A; MATOS M. y FIGUEIREDO J. (2010) Sistemas de cultivo *in vitro* para el desenvolvimiento de ovocitos inmaduros de mamíferos. Revista Brasileña de Reproducción Animal. Vol. 34, 527 Pág.
10. DONE M.A.N. y ADONA P.R. (2001) Developmental capacity of bos indicus oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. Animal reproduction science. Vol. 65, 1124 pág.
11. FERNÁNDEZ, A. et al. (1997) Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de Vacas cebú postmortem. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, vol. 05 Maracay, Venezuela. Archivo Latinoamericana de Producción Animal Vol. 5, 946 Pág.
12. FREI ORTIZ, M. A. (2004) Desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos bovinos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus, Facultad De Acuicultura Y Ciencias Veterinarias, Universidad Católica De Temuco, Chile.
13. FERNÁNDEZ A; DIAS T. y MUÑOZ G. (2007) Producción *in vitro* de embriones bovinos. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad central de Venezuela. vol. 48, 1216 Pág.
14. GARDNER, D. K. et al. (2005) A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo, editorial Oxford University Press. USA.
15. GORDON, I. (2004) Tecnología de la reproducción de los animales de granja, editorial Acribia, España.
16. GORDON, I. (2003) Laboratory production of cattle embryos. Editorial CABI Publishing, Second Edition, USA.

17. GIGLI I; RUSSO A. y AGUERO A. (2006) Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélido sudamericano. Revista de investigación veterinaria. Vol. 8, 1095 pág. Argentina.
18. HAFEZ, (2002) Reproducción e inseminación artificial en animales, Editorial Mc. Graw Hill séptima edición, México.
19. HERNANDEZ F. H. (2004) Fecundación In Vitro, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. Maracaibo – Venezuela.
20. HERRADON, PG et al. (2007) Fecundación In Vitro Alternativa Para La Mejora Genética En Bovinos, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, vol. 15, España.
21. HENDERSON K.M; Mc NATTY K.P; SMITH P; GIBB M; y PRISK M.D. (1987) Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells in vitro. Journal of reproduction and fertility. Vol. 79, 3576 pág.
22. HAY M.F; MOOR R.M. y DOOT H. M. (1979) Regeneration of atretic sheep ovarian follicles in vitro. Journal of reproduction and fertility. Vol. 55, 967 pág.
23. HILLENSTIO, T. y MARIE, W. (1980) Gonadotropin releasing hormone agonist stimulate meiotic maturation of follicle enclosed rat oocytes *in vitro*. Nature, vol. 287, 2567 pág.
24. KAFI M; Mc GOWAN M.R. y KIRKLAND P.D. (2002) In vitro maturation of fertilization of bovine oocytes and in vitro culture of presumptive zygotes in the presence of bovine pestivirus. Animal reproduction science. Vol. 71, 786 pág.

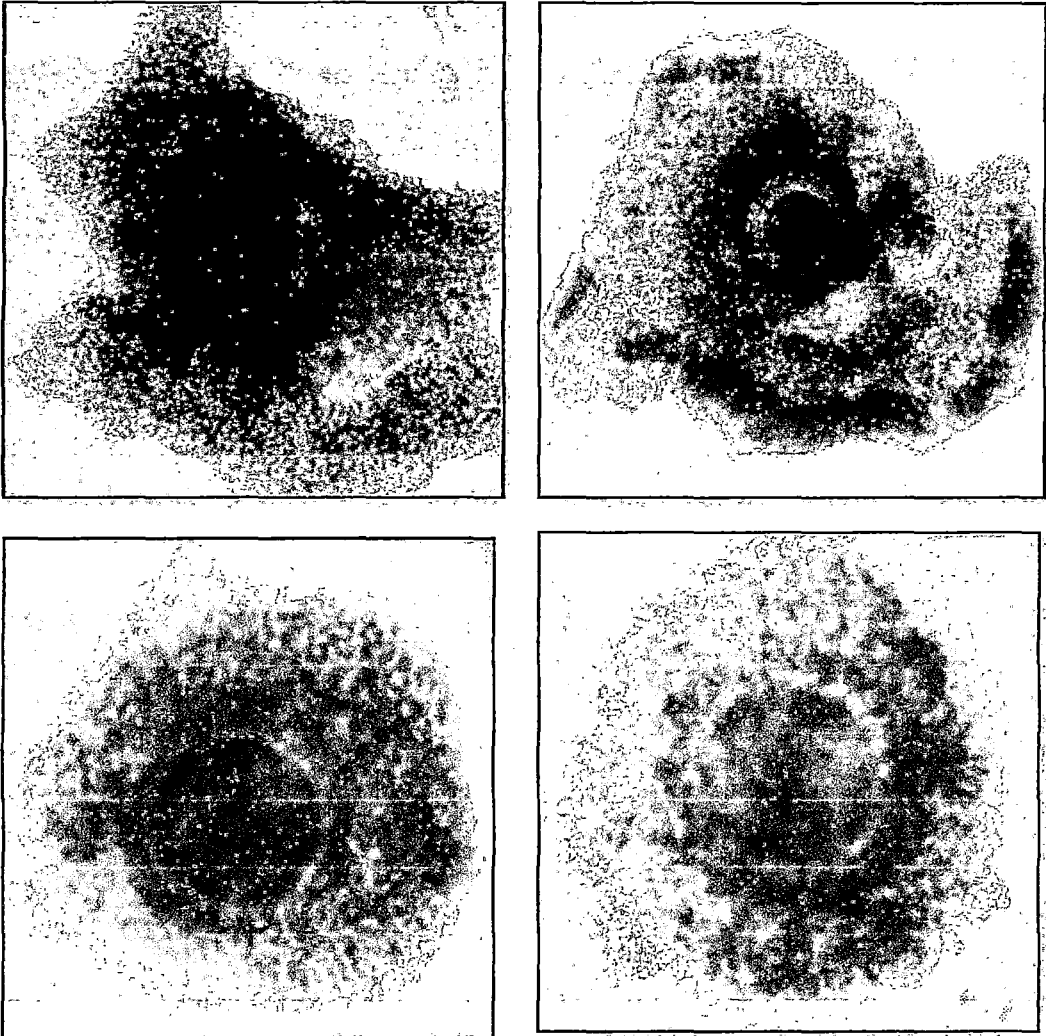
25. KENNETH R. y WRIGHT R. (1983) In vitro fertilization of ovulated and ovarian ovine oocytes. Journal animal science. Vol. 57, 1012 pág.
26. LOPEZ B. J. y col. (1996) Nuevas Técnicas De Reproducción Asistida Aplicadas a La Producción Animal, Ediciones De La Universidad De La Castilla- La Mancha, España.
27. LAROCCA, C et al. (1998) Viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro congelados-descongelados en dos medios de cultivo con  $\beta$ -mercaptoetanol, laboratorio de trasplante de embriones y biotecnología. Facultad de veterinaria. Montevideo. Uruguay.
28. LEIBFRIED L. y FIRST (1979) Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. University of Wisconsin. Journal Animal Science. Vol. 48, 924 pág.
29. LEIFRIED M. L; CRITSER E.S; EYESTONE W.H; NORTHEY D.L. y FIRST N.L. (1987) Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. Biology of reproduction. Vol. 36, 1325 pág.
30. LORENZO G. P. (1992) Maduración in vitro de oocitos en vacunos. Universidad complutense de Madrid. España.
31. DEL CAMPO M. y DONOSO X. (2007) Metodología y técnicas para realizar fertilización in vitro en bovinos, Universidad De La Frontera, Temuco, Chile.
32. MUCCI, N. et al. (2006) Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Balcarce, Argentina. Arch. Med. Vet. Vol. 38, 972 pág.

33. MOOR R.M. y TROUNSON A.O. (1977) Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *Journals of reproduction and fertility*. Vol. 49, 1336 pág.
34. PALMA, G. A. et al. (1993) *Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción*, Munich- Alemania.
35. PTASZYNSKA, M. (2007) *Compendio de reproducción animal*, novena edición, editorial intervet, Uruguay.
36. PALOMINO MARTORELL H. (2000) *Biotecnología del trasplante y micromanipulación de embriones de bovinos y camélidos de los andes*. A.F.A. editores, primera edición, Perú.
37. PICTON H.M; HARRIS S.E; MURUVI W. y CHAMBERS E.L. (2008) The in vitro growth and maturation of follicles. *Society for reproduction and fertility*. Vol. 136, 2286 pág.
38. REA, M. et al. (2001) Obtención de embriones por maduración y fertilización in vitro de oocitos bovinos. Vol. 09, 942 pág. Universidad Mayor De San Andrés, Bolivia.
39. RIZOS D; WARD F; DUFFY P; BOLAND M. y LONERGAN P. (2002) Consequences of bovine oocytes maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*. Vol. 61, 818 pág.
40. SALGADO R; VERGARA O. y RAMIREZ L. (2010) Efecto de las gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos cultivados in vitro. *Rev. MVZ* Vol. 15, 1960 pág.
41. SQUIRE, E. J. (2003) *Applied Animal Endocrinology*, Editorial CABI Publishing, USA.

42. SAEKI K; HOSHI M; LEIBFRIED M. L. y FIRST N.L. (1991) In Vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biology of Reproduction*. Vol. 44, 1200 pág.
43. SHALGI R; DEKEL N. y KRAICER P.F. (1979) The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro. *Journal of reproduction and fertility*. Vol. 55, 1039 pág.
44. TAKADA L. (2008) Efeito da melatonina sobre a maturação dos ovócitos em sistema tradicional de produção in vitro de embriões bovinos, Universidad de Sao Paulo, Brasil.
45. VILLAREAL R. y GARCIA F. (2005) Producción de embriones de bovinos in vitro a partir de medios de cultivo para humanos, con la utilización de hormonas HCG y FSH. *Avances en la investigación de la Universidad de Guadalajara*. México.
46. XU K.P; GREVE T; CALLESEN H. y HYTTEL P. (1987) Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *Journals of reproduction and fertility*. Vol. 81, 728 pág.
47. ZUELKE K. A. y BRACKETT B. (1990) Luteinizing hormone enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology of reproduction*. Vol. 43, 1322 pág.

## **ANEXOS**

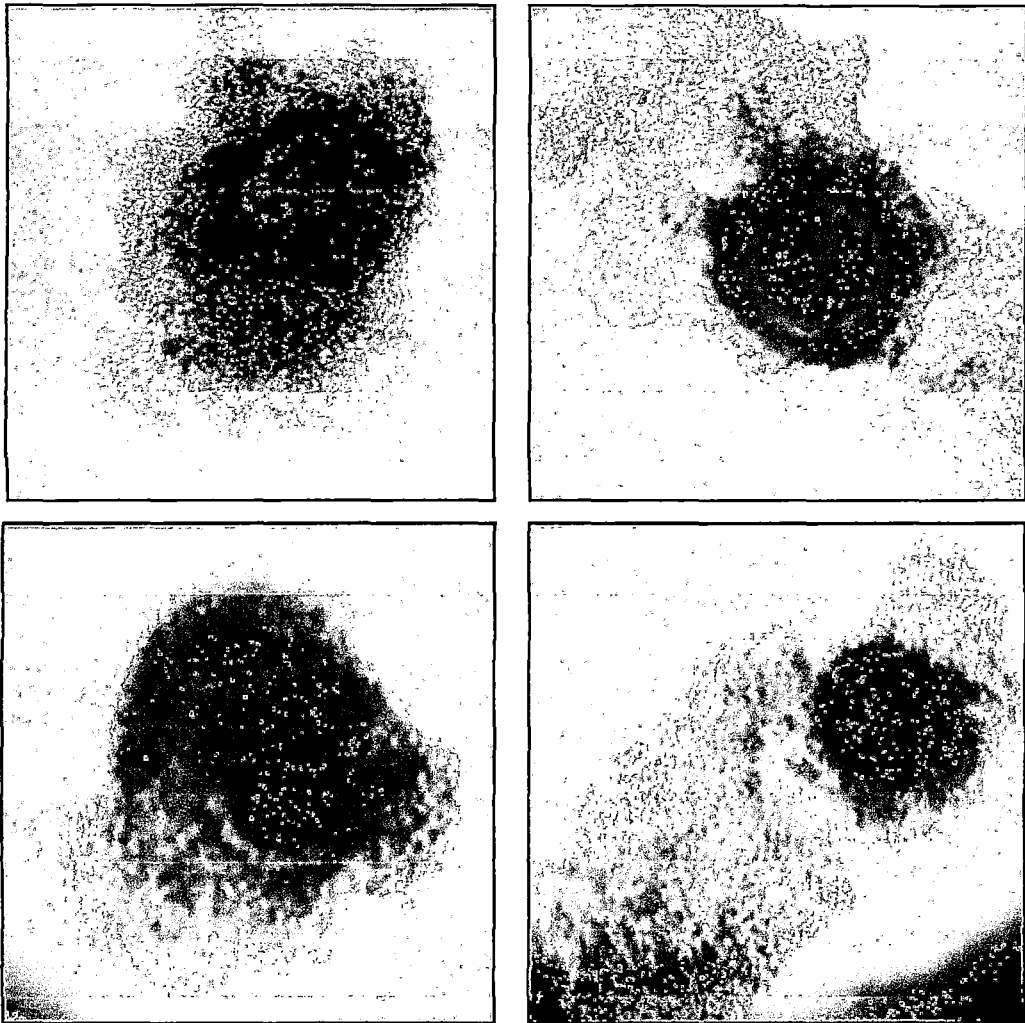
## ANEXO 1



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de ovocitos bovinos de la categoría I de muy buena calidad con más de 5 capas de células del cumulus compactas y citoplasma homogéneo con zona pelucida completa.*

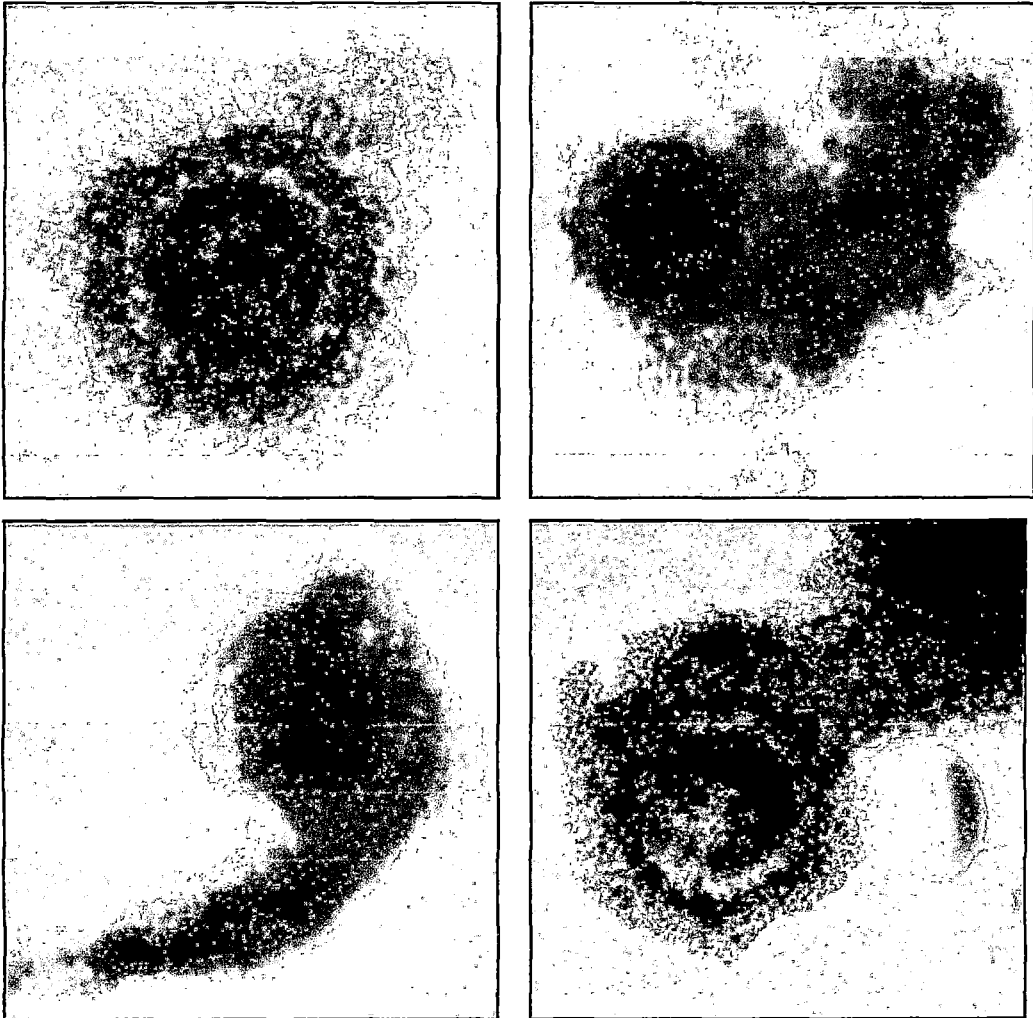
## ANEXO 2



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de ovocitos bovinos de la categoría II de buena calidad donde se muestra con tres capas de células del cumulus compactas, citoplasma homogéneo y completo dentro de la zona pelucida.*

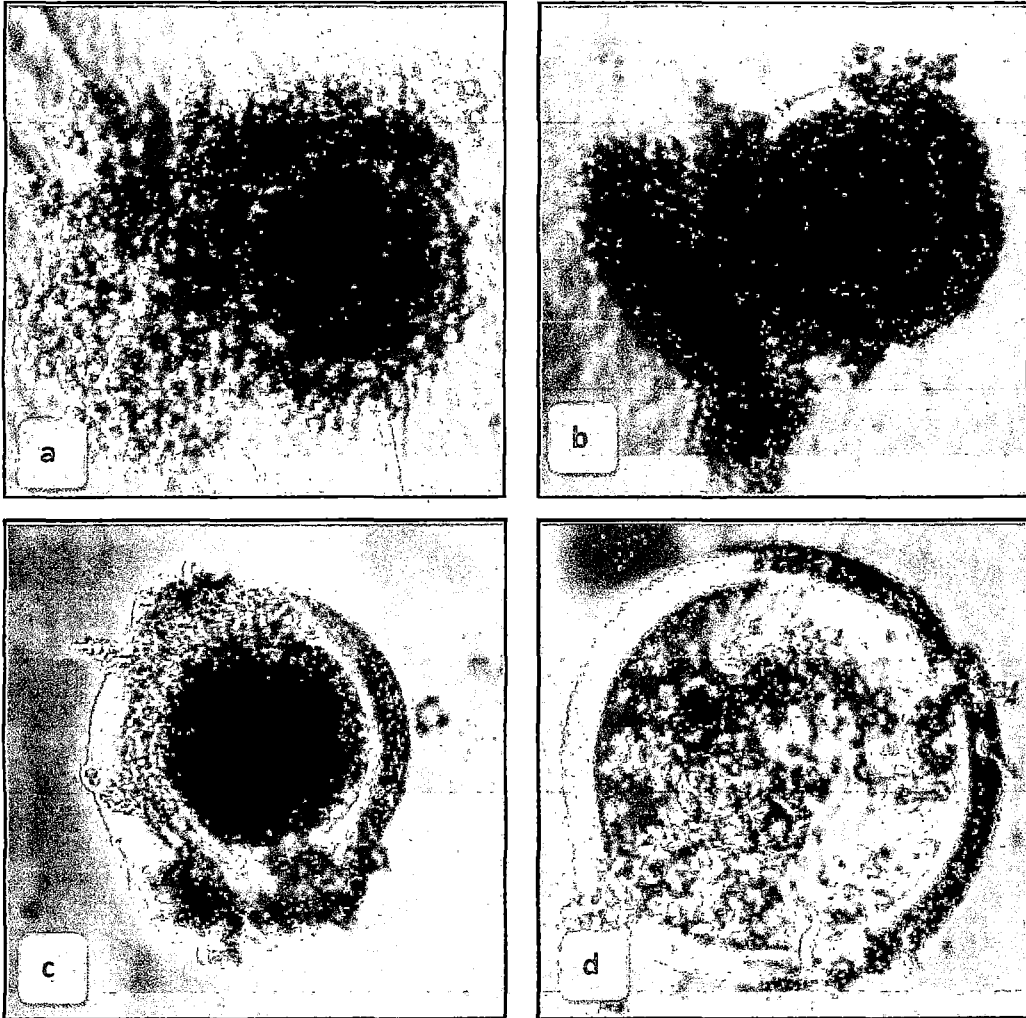
### ANEXO 3



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de ovocitos de la categoría III con una o dos capas de células del cumulus.*

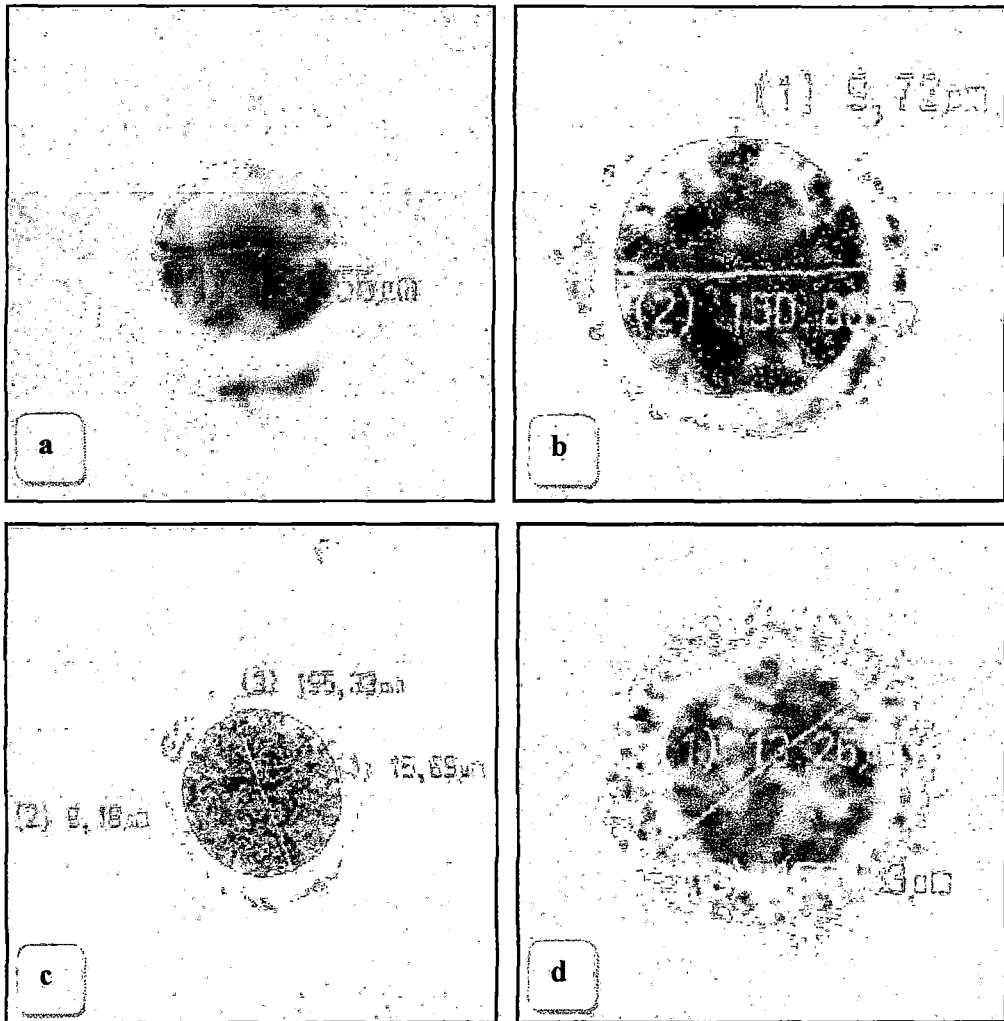
#### ANEXO 4



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de ovocitos de la categoría IV las imágenes a y b ovocito con células del cumulus incompleta y citoplasma granulado. c) ovocito con muy pocas células del cumulus adheridos a su zona pelucida. d) ovocito con zona pelucida rota y sin contenido citoplasmático.*

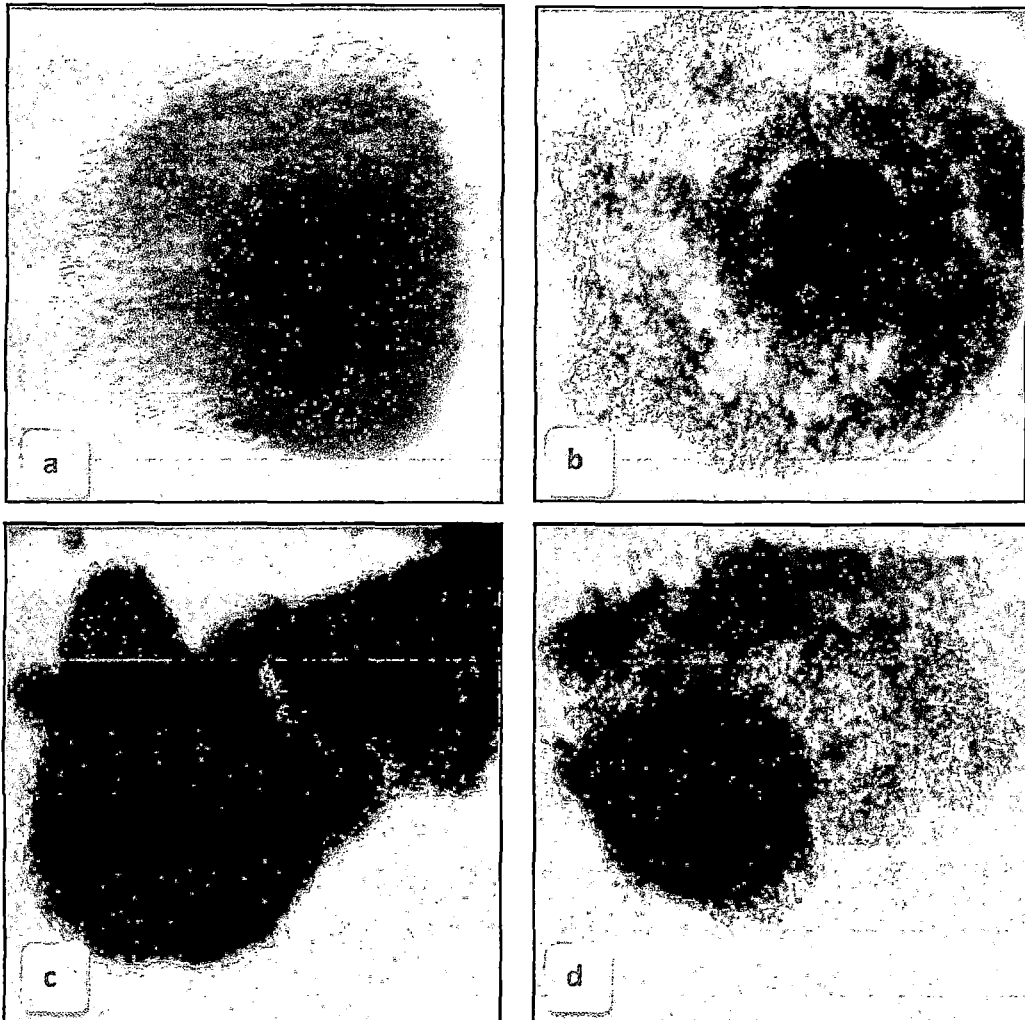
## ANEXO 5



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de las medidas de algunos ovocitos bovinos después de 5 días de cultivo en PBS (fosfato buffer salino) (a y b) muestra la medida solo del ovocito sin zona pelucida, (c y d) medidas del ovocito mas zona pelucida.*

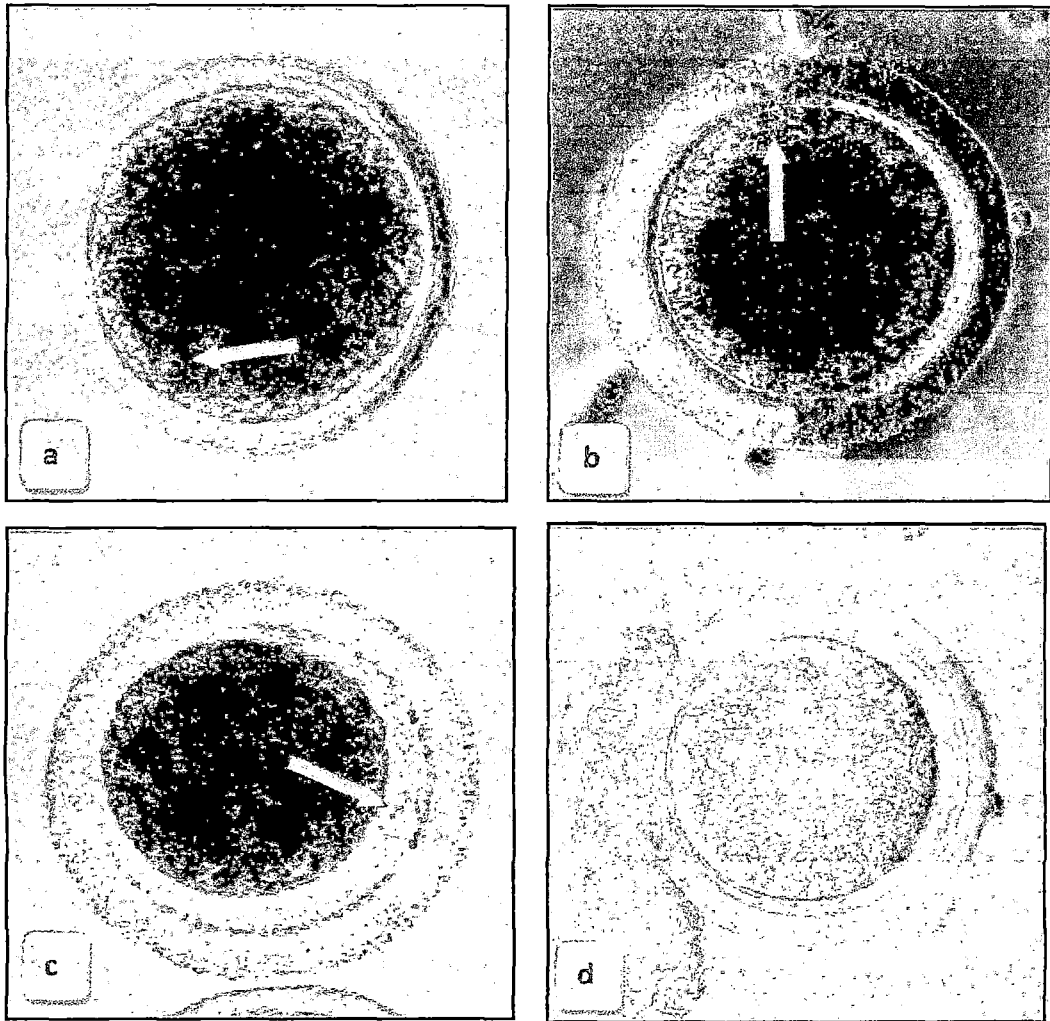
## ANEXO 6



*Fuente: Elaboración propia*

*Las imágenes a y c son ovocitos antes de la maduración nótese las células del cumulus se muestran compactas, en las imágenes b y d se observan la expansión de sus células del cumulus después de 24 horas de maduración in vitro.*

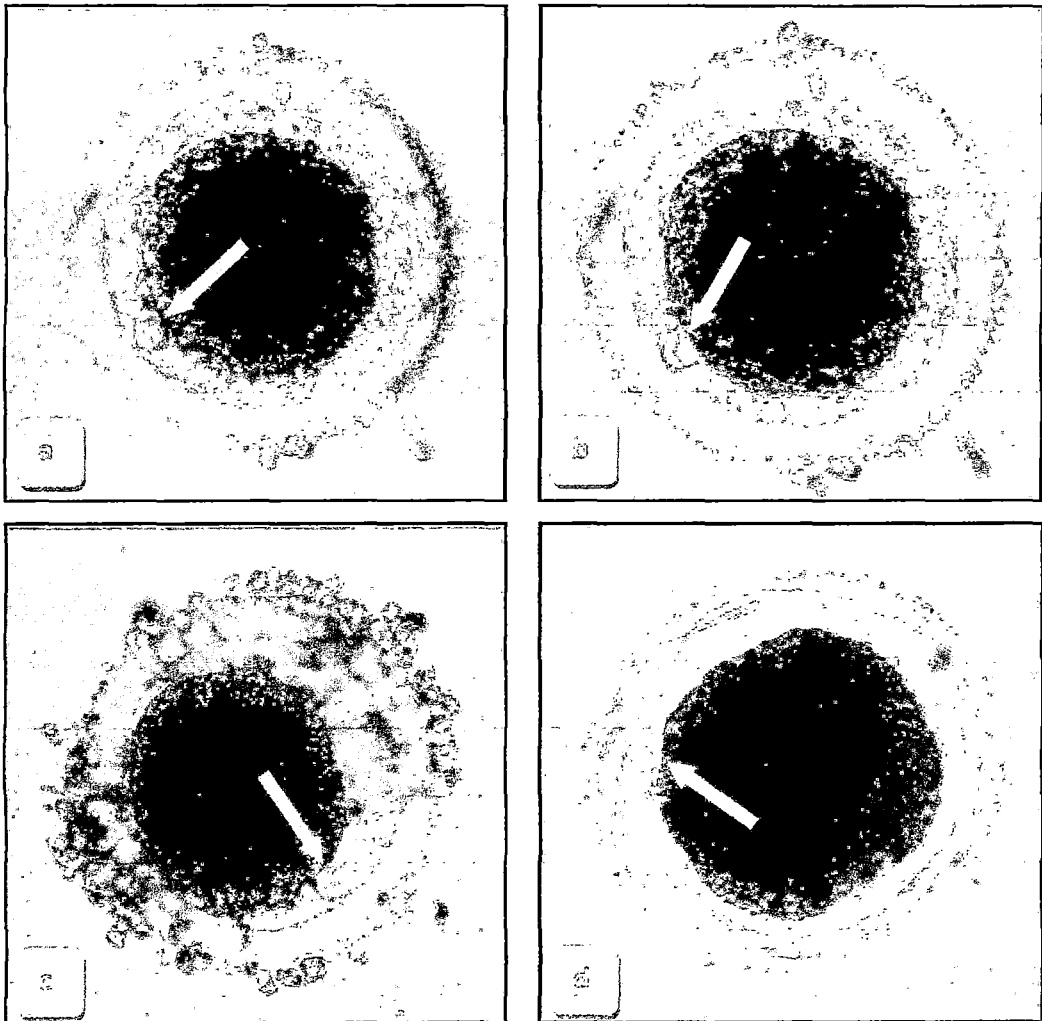
## ANEXO 7



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de ovocitos bovinos después de 24 horas de maduración in vitro y sometido a vortex por un minuto. Las imágenes a, b y c muestran ovocitos con el primer corpúsculo polar. La imagen d muestra un ovocito no madurado nótese en el espacio perivitelino en el cual no presenta el primer corpúsculo polar.*

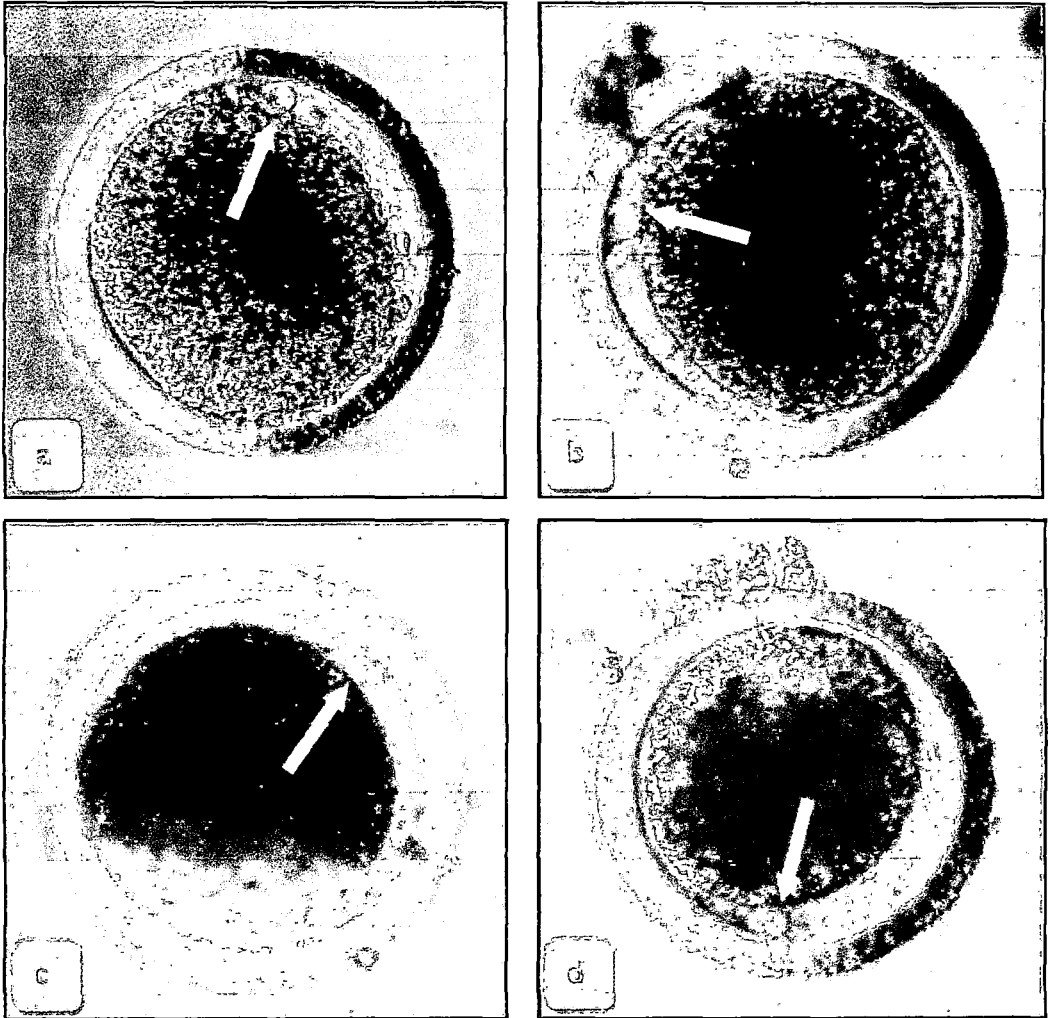
## ANEXO 8



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de ovocitos bovinos madurados en medio TCM 199 + GnRH. Las figuras a, b y c muestran ovocitos con el primer corpúsculo polar y con una zona pelúcida gruesa intacta mientras que la figura c presenta una zona pelúcida irregular el cual indica el comienzo de la degeneración del ovocito*

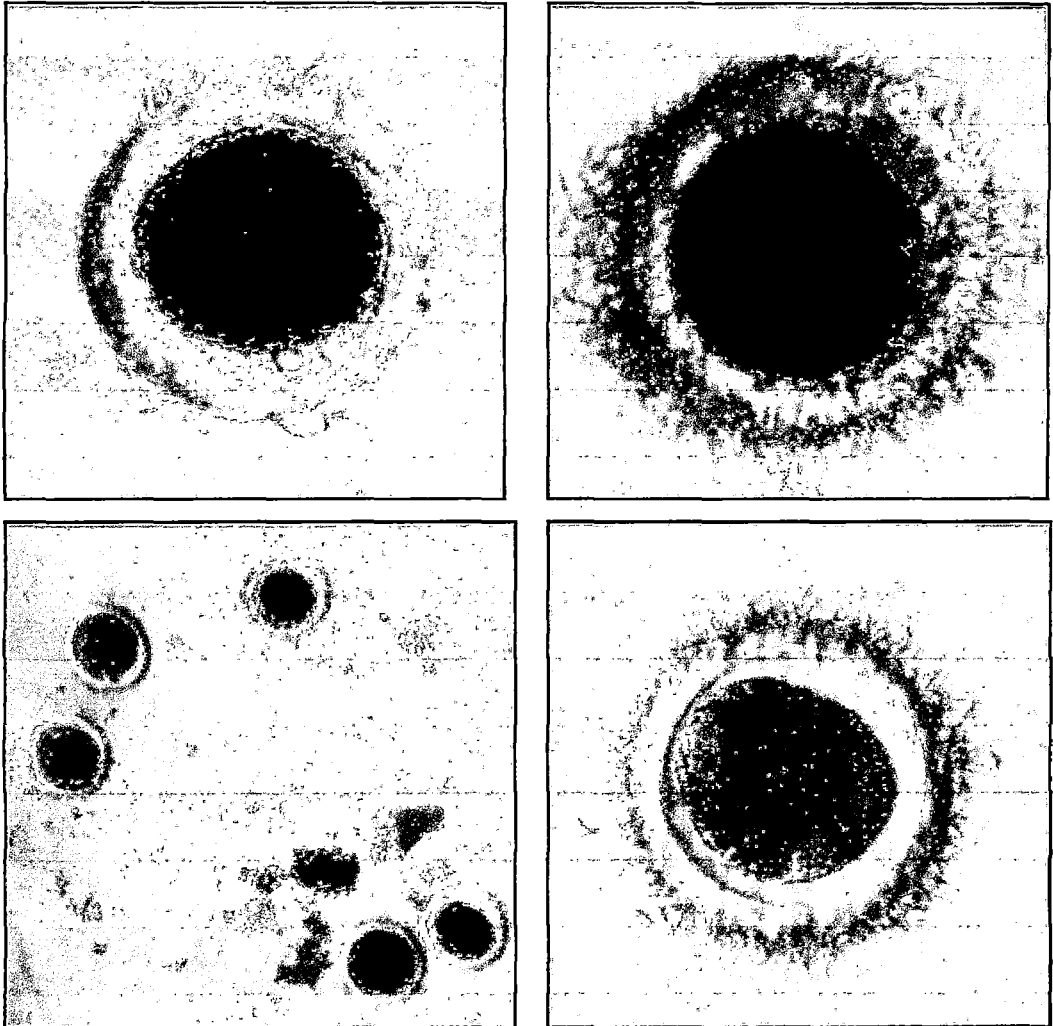
## ANEXO 9



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de ovocitos bovinos madurados en medio  
TCM 199 + LH mostrando el primer corpúsculo polar.*

## ANEXO 10



*Fuente: Elaboración propia*

*Imágenes representativas de ovocitos maduros en medio de fecundación  
nótese los espermatozoides adheridos a la zona pelucida.*

## **Anexo 11: soluciones stock para maduración in vitro**

### **11.1. Solución de gentamicina. 16mg/5ml**

agente	cantidad
Gentamicina 160mg/2ml	0,2ml
Solución PBS	4,8ml

### **11.2. Solución de estradiol. 125mg/5ml**

agente	cantidad
Estradiol 2,5mg/1 ml	0,5ml
Solución PBS	4,5ml

### **11.3. Solución de FSH. 2mg/5ml**

agente	cantidad
Folltropin (400mg)	0,1ml
Solución PBS	4,9ml

### **11.4. Solución de LH (700UI/ml)**

agente	cantidad
Choluron (5000UI/ml)	0,1ml
Solución PBS	4,9ml