

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA

**EFFECTO DE LA ROSCOVITINA EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE
OVOCITOS PORCINOS**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

AUTOR: Bach. ALEX MILTON LLAJA COTRINA

CHACHAPOYAS – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA

**EFFECTO DE LA ROSCOVITINA EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE
OVOCITOS PORCINOS**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

AUTOR : Bach. ALEX MILTON LLAJA COTRINA

ASESOR 1 : M.V. Nilton Luis Murga Valderrama

ASESOR 2 : Blgo. Jenin Víctor Cortez Polanco

CHACHAPOYAS – PERÚ

2018

DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien

Dedico esta tesis a todos aquellos que no creyeron en mí, a aquellos que esperaban mi fracaso en cada paso que daba hacia la culminación de mis estudios, a aquellos que nunca esperaban que lograra terminar la carrera, a todos aquellos que apostaban a que me rendiría a medio camino, a todos ellos dedico esta tesis demostrando todo lo contrario y que todo lo que uno se proponga lo puede conseguir.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecer a Dios, por darme la bendición en la vida y la salud para cumplir mis objetivos y por ser mi fuerza espiritual en todos los momentos.

A mi madre, por ser la que me brinda su apoyo incondicional para cumplir cada objetivo trazado y por darme todo el amor y la comprensión que necesito para hacerle frente a las adversidades de la vida.

A mi asesor y supervisor de prácticas por haberme permitido realizar mis practicas pre profesionales, por su gran apoyo y conocimientos brindados; y a todo el personal que labora en dicha institución ya que con su ayuda nos brindan a incrementar nuestros conocimientos en mi formación académica.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI
RECTOR**

**Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLON
VICERRECTOR ACADÉMICO**

**Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN**

**Phd. ILSE CAYO COLCA
DECANA DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA
ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA**

JURADO EVALUADOR

Mg. Sc. SEGUNDO JOSÉ ZAMORA HUMANA
PRESIDENTE

Ing. WIGOBERTO ALVARADO CHUQUI
SECRETARIO

Ing. CESAR AUGUSTO MARAVI CARMEN
VOCAL

VISTO BUENO DEL ASESOR 1

El docente de la UNTRM-A que suscribe el presente trabajo de tesis, Nilton Luis Murga Valderrama, de profesión Médico Veterinario, Docente de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, te hago constar:

Que he asesorado el proyecto de tesis denominado **“EFECTO DE LA ROSCOVITINA EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS”** presentado por el Bachiller **ALEX MILTON LLAJA COTRINA**, egresado de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista, comprometiéndome a colaborar en la elaboración, presentación, levantamiento de observaciones, ejecución del proyecto de tesis y presentación del informe final para la sustentación del mismo.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado, para fines que estime conveniente.

Chachapoyas, ____ de enero del 2019.

Atentamente:

M.V. Nilton Luis Murga Valderrama

VISTO BUENO DEL ASESOR 2

El docente de la UNTRM-A que suscribe el presente trabajo de tesis, Jenin Víctor Cortez Polanco, de profesión Biólogo, Docente de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, te hago constar:

Que he asesorado el proyecto de tesis denominado **“EFECTO DE LA ROSCOVITINA EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS PORCINOS”** presentado por el Bachiller **ALEX MILTON LLAJA COTRINA**, egresado de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista, comprometiéndome a colaborar en la elaboración, presentación, levantamiento de observaciones, ejecución del proyecto de tesis y presentación del informe final para la sustentación del mismo.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado, para fines que estime conveniente.

Chachapoyas, ____de enero del 2019.

Atentamente:

Blgo. Jenin Víctor Cortez Polanco

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo ALEX MILTON LLAJA COTRINA con DNI N° 72160414, estudiante de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada: **“Efecto de la roscovitina en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos”**.

La misma que presento para optar el **título profesional de Ingeniero Zootecnista**

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumiendo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo por la presente me comprometo asumir todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente: asumimos las consecuencias y sanciones civiles y penales que de nuestra acción se deriven.

Chachapoyas ____ de enero del 2019

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos	4
III. MARCO TEÓRICO	4
3.1 Bases teóricas	4
3.1.1 Ovogénesis.....	4
3.1.2 Crecimiento del folículo y del ovocito	6
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Material de estudio.....	16
4.2. Diseño experimental	17
4.3. Técnicas	18
4.4. Procedimiento	18
Recolección de ovarios	18
Maduración in vitro (MIV) de ovocitos.....	18
4.5. Análisis de datos.....	20
V. RESULTADOS	20
VI. DISCUSIONES	22
VII. CONCLUSIÓN	23
VIII. RECOMENDACIONES	23
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	24
X. ANEXOS	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema experimental para la maduración in vitro de ovocitos porcinos.....	17
Figura 2. Ovocito maduro en el esteroscopio	21
Figura 3. Ovocito maduro observado bajo tinción Hoechst.....	21
Figura 4. Distribución de medias y errores de los resultados	29
Figura 5. Protocolo para la maduración de ovocitos in vitro	30
Figura 6. Protocolo para la maduración de ovocitos in vitro: selección de ovocitos	31
Figura 7. Protocolo para la maduración de ovocitos in vitro: Selección de ovocitos pre madurados con tratamiento.....	32
Figura 8. Maduración de ovocitos	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de ovocitos madurados según prueba con y sin tratamientos.....	20
Tabla 2. Efecto de la roscovitina en la maduración de ovocitos	20
Tabla 3. Prueba T para muestras apareadas.....	29

RESUMEN

La presente investigación fue evaluar el efecto de la Roscovitina en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos. Se colectaron ovarios de cerdas extraídos del Camal Municipal de Chachapoyas, luego se transportó al Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Se aspiraron los ovocitos y se sometieron diez grupos a tratamiento con roscovitina y diez grupos control (sin tratamiento), todos fueron madurados bajo las mismas condiciones y se encontró que en promedio el grupo experimental obtuvo 51.20% de ovocitos maduros frente a un 46.00% del grupo control. Mediante la prueba T de Student para muestras apareadas se determinó diferencias altamente significativas (0,01). Los resultados evidencian un efecto positivo de la roscovitina en la maduración de ovocitos porcinos *in vitro*.

Palabras clave: Pre-maduración, inhibición meiótica, cuerpo polar.

ABSTRTACT

The present investigation was to evaluate the effect of Roscovitine in the in vitro maturation of porcine oocytes. Ovaries were collected from sows extracted from the Municipal Chachapoyas Camal, then transported to the Animal Biotechnology, Reproduction and Genetic Improvement Laboratory of the Toribio Rodríguez de Mendoza National University. The oocytes were aspirated and ten groups were subjected to treatment with roscovitine and ten control groups (without treatment), all were matured under the same conditions and it was found that on average the experimental group obtained 51.20% of mature oocytes versus 46.00% of the control group. Student's T-test for paired samples determined highly significant differences (0.01). The results show a positive effect of roscovitine on the maturation of porcine oocytes in vitro.

Key words: Pre-ripening, meiotic inhibition, polar body.

I. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población mundial y su efecto en el incremento de la demanda de alimentos ha ocasionado grandes presiones en los recursos naturales. El hombre ha desarrollado mecanismos que le permitan cada vez con mayor eficiencia, aprovisionarse de los alimentos. La ganadería es uno de los sectores productivos con alto grado de tecnificación y uno de las acciones con resultados esperanzadores es la biotecnología (Urrego & Restrepo, 2006); además, es latente el reto de reducir la importación de alimentos de origen animal y para ello es necesario potenciar las unidades productivas rurales que generalmente cuentan con sistemas de producción poco competitivas (Vivanco, 2007).

El desarrollo de tecnologías de reproducción asistida en animales, implica un gran avance en la biotecnología animal. Se ha logrado intervenir y controlar la reproducción y la genética como la clonación e incluso la transgénesis (Hansen, 2006). Muchos estudios se han realizado al respecto y existe una amplia literatura en diferentes campos.

Uno de los hitos más importantes en biotecnología, es la clonación de cerdos con la finalidad de producir órganos que podrían ser trasplantados a seres humanos (Borlaug, 2002).

Aunque se ha avanzado mucho en la producción de embriones porcinos clonados, se ha encontrado muchas dificultades, sobre todo en aquellos producidos a partir de ovocitos madurados *in vitro*. No se ha determinado aún si los problemas se deben a condiciones de cultivo o a la reducción de la competencia de los ovocitos madurados. Por lo que es necesario evaluar procesos de maduración de ovocitos, clonación y transgénesis que permita estandarizar protocolos de producción de embriones porcinos de calidad (Hansen, 2006).

Uno de los principales problemas que presentaba la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos porcinos era la baja formación del pronúcleo masculino (PNM). Yoshida, Ishigaki, Nagai, Chikyu y Pursel (1993), demostraron que durante la maduración *in vitro* del ovocito se produce síntesis intracelular de glutatión y que éste es un importante factor citoplasmático para regular la descondensación espermática y la formación del pronúcleo masculino tras la penetración. Al parecer, el glutatión es necesario para la reducción de los puentes disulfuro de la protamina espermática requerida para iniciar la

descondensación. Diferentes estudios han demostrado que la utilización de medios con bajo contenido en sal, la adición de fluido folicular y la adición de cisteína al medio de maduración incrementa el contenido en glutatión del ovocito y, en consecuencia, mejoran su capacidad de formación del pronúcleo masculino (Funahashi, Cantley, & Day, 1994; Yoshida et al., 1993; Yoshida, Ishigaki, & Pursel, 1992). Así, este problema ha sido hoy en día resuelto gracias a la aplicación de una serie de modificaciones en las condiciones de maduración, fundamentalmente consistentes en la adición de cisteína, cisteamina y glutamina al medio de maduración (Coy & Romar, 2002; Funahashi, 2003). En la actualidad, la medición del contenido intracelular de GSH en los ovocitos se utiliza como un muy buen indicador de maduración citoplasmática, y cuando se modifican los tratamientos de MIV para conseguir mejoras, es necesario medir este parámetro para valorar si la formación del pronúcleo masculino se verá afectada por las modificaciones introducidas.

Otro de los problemas presentes, además del grado de maduración cuando se utilizan ovocitos no ovulados fisiológicamente, es el hecho de que algunos ovocitos/folículos están programados para muerte celular o apoptosis dando lugar a la atresia de éstos (Kane, 2003). Un porcentaje de folículos presentes en el ovario se encuentran en diferentes estadios de atresia (Markstrom, Svensson, Shao, Svanberg, & Billig, 2002). Probablemente, este proceso de apoptosis comience en el folículo y posteriormente afecte al ovocito. Existen evidencias de que complejo cumulus ovocito (COCs) de buena calidad, aislados de folículos que presentan un grado elevado de apoptosis en sus paredes, pierden su capacidad de desarrollo posterior (Jewgenow, Heerdegen, & Müller, 1999). En el ovario existen diferentes reguladores específicos de la apoptosis, incluyendo hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Markstrom et al., 2002). Por otra parte, se ha estudiado recientemente una relación entre el grado de atresia presente en el cumulus y la competencia ovocitaria; un menor grado de atresia está asociado con ovocitos de elevada capacidad de desarrollo (Hendriksen, Vos, Steenweg, Bevers, & Dieleman, 2000).

El principal problema en el estudio de la atresia relacionada con la capacidad de desarrollo ovocitaria es que no existen criterios macroscópicos que nos permitan seleccionar y clasificar los folículos de acuerdo a su estado de salud. Los criterios normalmente utilizados para la determinación de la atresia son bioquímicos y no nos permiten su uso previo a la MIV (Mermillod, Oussaid, & Cognié, 1999). Grimes &

Ireland (1986), en la especie bovina, sugieren que la apariencia de la superficie de los folículos puede ser utilizada como criterio de selección de los futuros ovocitos y así, incrementar los índices de maduración in vitro. Estos autores proponen la clasificación de los folículos en dos categorías: folículos claros y folículos opacos. En este estudio, se demuestra que los ovocitos provenientes de folículos claros muestran tasas de maduración in vitro significativamente superiores a los ovocitos provenientes de los folículos opacos. También puede establecerse que los folículos claros tienen en su contenido menor concentración de estrógenos, progesterona y fluido folicular que los opacos.

Existen evidencias en algunas células de que la activación de la proteína quinasa-C inhibe la apoptosis (Kane, 2003), y es posible que pueda utilizarse este sistema de activación para inhibir la apoptosis y de esta manera incrementar el porcentajes de maduración ovocitaria.

Del mismo modo, las futuras innovaciones en los sistemas de MIV van encaminadas a la corrección de otro problema como es la maduración citoplasmática, que se ve asociada a la capacidad de desarrollo posterior. Los ovocitos madurados in vitro presentan una capacidad de desarrollo inferior a los madurados in vivo (Rodríguez & Farin, 2004). Cuando el ovocito es liberado del ambiente folicular y transferido a un medio de maduración adecuado, en varias horas (dependiente de especie), este ovocito alcanza el estadio de MII y está listo para ser fecundado (Staigmiller & Moor, 1984). A pesar de que los ovocitos maduros a nivel del núcleo pueden ser fecundados, éstos pueden ser incompetentes en el desarrollo posterior, debido a deficiencias en ciertos factores citoplasmáticos necesarios para la completa maduración. Por ejemplo, las condiciones en las que se produce la maduración in vitro pueden causar movimientos incompletos de las mitocondrias en el citoplasma del ovocito, y por lo tanto, afectar a la maduración posterior (Sun et al., 2001).

Una incompleta maduración citoplasmática puede dar lugar a fallos durante la fecundación incluyendo la polispermia y una asincronía en la formación pronuclear (Mattioli, Galeati, & Seren, 1988) que se conocen como uno de los principales problemas de la baja capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados in vitro (R. H. F. Hunter, 1991).

La adquisición de la capacidad de desarrollo ocurre durante el crecimiento del ovocito dentro del folículo y tiene lugar en diferentes estadios de desarrollo folicular (Mermillod et al., 1999). Los ovocitos que no completen la capacitación no serán competentes en el desarrollo posterior, aunque sean capaces de reanudar la meiosis y ser fecundados. Diversos tipos de inhibidores (fisiológicos y químicos) se han estado empleando para inhibir la reanudación de la meiosis e intentar mimetizar lo que ocurre en el interior del folículo en crecimiento, dando tiempo al ovocito a acumular transcritos e incrementar su calidad citoplasmática.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la Roscovitina en la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la Roscovitina en la pre-maduración de ovocitos porcinos
- Evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Bases teóricas

3.1.1 Ovogénesis

Durante el desarrollo fetal, las células germinales primordiales del ovario van a sufrir un proceso de diferenciación. Primero se transforman en ovogonias por sucesivas divisiones mitóticas, las cuales dan lugar a los ovocitos primarios al iniciarse la primera división meiótica.

La meiosis es un tipo de división celular exclusiva de las células germinales (ovogonias y espermatogonias) y su objetivo es doble: la reducción a un número haploide de cromosomas y la recombinación de la información genética (Polanski & Zubiak, 1999). Antes de sufrir la meiosis, las células germinales replican su ADN y contienen en ese momento 4 copias de ADN y un número $2n$

de cromosomas, como cualquier célula diploide; mientras que entre las dos divisiones meióticas la replicación de ADN queda suprimida, lo que asegura que los gametos resultantes sean haploides. La meiosis consiste en dos divisiones: en la primera, las dos células hijas pasan a tener $1n$ cromosomas y 2 copias de ADN; y en la segunda, las 2 células resultantes contienen $1n$ cromosomas y 1 copia de ADN. Así, con la meiosis se obtienen 4 células hijas haploides y genéticamente diferentes, en el caso del macho; mientras que en la hembra sólo da lugar a una célula, pues las dos divisiones meióticas son asimétricas, y en cada una se forman una célula grande y otra pequeña abortiva (corpúsculo polar). De este modo, se minimiza la pérdida de productos almacenados en el ovocito, necesarios para el posterior desarrollo embrionario temprano.

En las hembras, toda la población de ovocitos entra en meiosis sincrónicamente en la vida fetal. La primera división meiótica progresa hasta que el ovocito alcanza el estadio de diplotene difuso de la profase I (estado dictiatio), donde se produce la primera detención de la meiosis, justo antes o poco después del nacimiento. A partir de este momento, el ovocito comienza a ser rodeado por células pregranulosas, las cuales forman una membrana basal alrededor de ellas, quedando formado el compartimento folicular. La primera parada de la meiosis se mantiene hasta momentos antes de la ovulación o de la atresia folicular, y es importante para asegurar que el ovocito disponga de tiempo suficiente para crecer antes de la fecundación, de modo que sea capaz de mantener el proceso de la embriogénesis (Borlaug, 2002).

Esta interrupción se mantiene mediante un sistema de control múltiple en el que están implicados el adenosil monofosfato cíclico (AMPc) (Mattioli et al., 1988), la hipoxantina (Thibault, Szöllösi, & Gérard, 1987) y el factor inhibidor de la maduración del ovocito, entre otros factores, y cuya finalidad es mantener inactivo al factor promotor de la maduración (MPF). Se ha comprobado que el MPF es un regulador universal (desde las levaduras hasta el hombre) de la transición de la fase G2 a metafase tanto en la mitosis como en la meiosis, por lo que se ha propuesto llamarle factor promotor de la metafase, manteniendo las mismas siglas. El MPF está constituido por una proteinkinasa (p34cdc2) y una ciclina. Aunque no está muy claro el mecanismo por el que el AMPc regula la

detención meiótica, parece ser que su acción en el ovocito viene mediada por la proteinkinasa A que, a través de una cascada de reacciones bioquímicas no conocidas, previene la defosforilación de la proteinkinasa p34cdc2, manteniendo al MPF en un estado inactivo.

En este estadio, los ovocitos se caracterizan por tener un núcleo prominente, de (Moor, Mattioli, Ding, & Nagai, 1990) nominado vesícula germinal (VG), y por estar rodeados por una capa de células epiteliales (foliculares), lisas no proliferativas, conocidas como células pregranulosas, que ejercen un efecto inhibitorio sobre la meiosis y el crecimiento folicular. En el momento del nacimiento, la mayoría de los ovocitos han alcanzado este estadio y se encuentran formando los folículos primordiales, siendo la única fuente de gametos femeninos en el animal sexualmente maduro.

3.1.2 Crecimiento del folículo y del ovocito

El ovocito y el folículo sufren un periodo de crecimiento, que se caracteriza por ser una fase de intensa síntesis proteica y de almacenamiento de macromoléculas (Moor, Mattioli, Ding, & Nagai, 1990). El folículo primordial se transforma en folículo primario, donde el ovocito está rodeado por una capa unilaminar de células granulosas cuboides, derivadas de las pregranulosas. En el folículo primario se produce un aumento del volumen del ovocito, sin división celular del mismo, y una hiperplasia e hipertrofia de las células de la granulosa, dando lugar al folículo secundario (un folículo preantral multilaminar). En el ratón se ha identificado un factor de diferenciación del crecimiento, conocido como GDF-9, necesario en el inicio del crecimiento folicular al estimular la multiplicación de las células de la granulosa, y que solamente se expresa en el ovocito. El crecimiento folicular va acompañado de la formación de una capa de células de la teca vascularizada alrededor de la membrana basal.

Al alcanzar las células de la granulosa un número elevado, y en respuesta a la FSH, se forma la cavidad repleta de fluido folicular (Motlik, Crozet, & Fulka, 1984). Tras la formación del antro, las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones: por una parte, las células de la granulosa que revisten la pared del folículo y forman un epitelio estratificado en contacto con la lámina

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

El crecimiento del ovocito va unido a un aumento en el número de orgánulos citoplasmáticos, como mitocondrias, aparato de Golgi y ribosomas, y a la formación de los gránulos corticales a partir del complejo de Golgi. Toda esta maquinaria celular, indicativa de una elevada actividad metabólica, permite la síntesis y almacenamiento de ARN, proteínas y enzimas y, en las últimas etapas del crecimiento, el desarrollo de la red de microtúbulos y filamentos. También durante la fase de crecimiento se forma la zona pelúcida (ZP), una cubierta extracelular glicoproteica que rodea a los ovocitos mamíferos. La capa de células del cúmulus más próxima a la ZP se conoce con el nombre de corona radiata (Borlaug, 2002).

En esta etapa de crecimiento se van a establecer unas comunicaciones entre el ovocito y las células del cúmulus, mediante unos procesos citoplasmáticos de las células de la corona radiata que cruzan la ZP y conectan con el oolema, conocidos como uniones tipo gap. Las células de la granulosa también se interconectan mediante uniones tipo gap. Este entramado de uniones intercelulares posibilita el intercambio de moléculas entre el ovocito, las células de la granulosa y la circulación sanguínea, con una finalidad nutritiva y reguladora, constituyendo el proceso de “cooperación metabólica”. Las células somáticas proporcionan nucleósidos, aminoácidos y fosfolípidos, además de mantener un balance iónico y una estabilidad en el ARNm en los ovocitos (R. H. F. Hunter, 1991). Esta cooperación es bidireccional, de modo que los ovocitos porcinos secretan un factor de expansión del cúmulus, además de un(os) factor(es) soluble(s) que regula(n) la esteroidogénesis de las células del cúmulus, suprime(n) la luteinización y promueve(n) la proliferación de células de la granulosa en cultivo. No se han identificado estos factores solubles, aunque entre los candidatos estarían varios factores de crecimiento, incluido el GDF-9.

Los folículos dominantes serán seleccionados de entre los folículos antrales para continuar su crecimiento. La selección de los folículos que producirán ovocitos

maduros listos para ovular en cada ciclo estral está determinada por la expresión de receptores para la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) en sus células de la granulosa. Por ejemplo, en los folículos antrales pequeños, cuyas células de la granulosa no poseen receptores para la LH, la reanudación de la meiosis inducida por esta gonadotropina no se podrá producir; por lo tanto, los folículos seleccionados deberán disponer de estos receptores. Los receptores para la FSH, sólo presentes en la hembra en las células de la granulosa, aumentan de número en la fase de crecimiento. Al actuar sobre las células de la granulosa, la FSH va a desencadenar la expresión de una batería de genes que codifican factores de crecimiento, enzimas y proteínas involucradas en la esteroidogénesis y péptidos que regulan la liberación de gonadotropinas; los cuales se van a sintetizar y acumular en el fluido folicular. Además, las células de la teca, estimuladas por la LH, van a sintetizar andrógenos que, posteriormente, serán transformados en estradiol por las células de la granulosa.

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

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

Maduración del ovocito

La maduración del ovocito, dividida en maduración nuclear y citoplasmática, hace referencia a todos los cambios nucleares, citoplasmáticos y de membrana que sufre el ovocito, con el fin de prepararse para ser fecundado con éxito y desarrollarse posteriormente.

El estímulo que desencadena el inicio de la maduración del ovocito es el aumento preovulatorio en los niveles de gonadotropinas, en especial de LH. Además de la reanudación de la meiosis, el pico de la LH desencadena otras transformaciones dentro del folículo, como alteraciones en la esteroidogénesis folicular y cambios en el complejo cúmulus-ovocito (COCs) (Moor et al., 1990; Motlik et al., 1984). La respuesta inmediata de las células de la granulosa a la interacción con la LH es la activación de la adenilato ciclasa y la generación de AMPc.

Por tanto, la reanudación de la meiosis viene precedida por un aumento en el AMPc; lo que parece estar en contradicción con su actuación en el manteniendo del bloqueo meiótico en el ovocito. La explicación es que el AMPc desempeña un papel doble en la regulación de la meiosis. Los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas en los folículos antrales pequeños son transferidos de manera continua al ovocito, a través de las uniones tipo gap, para mantenerlo en la parada meiótica, pues el ovocito no es capaz de producir AMPc a los niveles necesarios. Sin embargo, a partir de la formación de receptores para la LH en las células del cúmulus y granulosa del grupo de folículos dominantes, éstos pueden responder al pico preovulatorio de la LH produciendo grandes cantidades de AMPc. Las elevadas concentraciones de AMPc en los folículos dominantes median en la acción de la LH sobre la conexina 43, una proteína que forma parte de las uniones tipo gap ováricas. Mediante reacciones de fosforilación/ defosforilación, se producen cambios en la conformación de la conexina 43 que inducen una inmediata reducción de las comunicaciones intercelulares en dichos folículos y, por tanto, en la cooperación metabólica entre sus células. Este fenómeno, conocido como expansión o mucificación del cúmulus, se produce 16 horas después del pico de gonadotropinas. Bajo esas condiciones, el flujo de AMPc desde las células del cúmulus hacia el ovocito desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación del factor promotor de la maduración (o de la metafase) (MPF) y el ovocito reanuda la meiosis. Esto explica por qué se produce una reanudación espontánea de la meiosis al extraer los ovocitos de los folículos y cultivarlos in vitro, incluso en ausencia de hormonas, como consecuencia del rápido deterioro de la integridad

morfológica de las células foliculares (Moor et al., 1990) que conlleva una disminución en el flujo de AMPc hacia el ovocito (Motlik et al., 1984).

La maduración nuclear comienza tras la reanudación de la meiosis. El paso de VG a metafase II (MII) conlleva: la disolución de la membrana nuclear conocida como “rotura de la vesícula germinal”, la formación del huso meiótico y la condensación de la cromatina en cromosomas homólogos que se alinean en el huso, alcanzando entonces el estadio de metafase I; para continuar con la segregación de los dos grupos de cromosomas homólogos, dando lugar a la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) y al paso del ovocito al estadio de MII. La maduración nuclear finaliza cuando el ovocito completa la primera división meiótica con la formación del primer CP, alcanzando el estadio de MII, unas 36-40 horas después del pico de LH (R. H. F. Hunter, 1991), tras lo cual se produce la segunda detención de la meiosis.

El MPF en forma activa es necesario para la rotura de la VG, la condensación de la cromatina, y su actividad alcanza un pico en metafase I y II, para decrecer en anafase I y II, lo que indica que su inactivación también es necesaria para esta progresión. Por otra parte, la reorganización de los microtúbulos y la apropiada orientación del huso durante la MI parece estar mediada por las MAP kinasas (MAPK), cuya actividad también está inhibida de algún modo por el AMPc y aumenta con la reanudación de la meiosis. A diferencia del MPF, la actividad de las MAPK permanece elevada en los estadios de anafase.

La maduración citoplasmática, en cambio, es un término más amplio que abarca una serie de acontecimientos no directamente relacionados con la progresión de la meiosis pero que preparan al ovocito para la fecundación y el desarrollo embrionario posteriores.

En el citoplasma del ovocito se produce una redistribución de las mitocondrias y de los gránulos corticales (GC). Tras la rotura de la VG, las mitocondrias migran para situarse en una posición perinuclear durante la maduración (Cran & Cheng, 1986; Thibault et al., 1987), siendo este movimiento mitocondrial necesario para la progresión de la maduración (Moor et al., 1990). Los GC son un tipo especial de lisosomas primarios, formados a partir del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, compuestos por glicoproteínas y enzimas

hidrolíticas. Los GC migran hacia la periferia del ovocito, aumentan de número al final del periodo de maduración y se sitúan debajo de la membrana plasmática formando una monocapa (Cran & Cheng, 1986); circunstancia que será fundamental para el bloqueo de la poliespermia.

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

a. Maduración citoplasmática

Los cambios que acontecen en el paso de ovocito primordial hasta embrión transcripcionalmente activo se pueden dividir en tres:

Programa de crecimiento único o capacitación ovocitaria

Que es el proceso de preparación del ovocito durante la foliculogénesis que posibilita un desarrollo embrionario posterior (Moor et al., 1990). En este periodo sólo se dividen las células somáticas, no el ovocito. Representa un período de síntesis intensa y almacenamiento de macromoléculas. El ovocito durante esta etapa es incapaz de pasar del estadio del ciclo celular G2 a metafase. Las células foliculares proporcionan soporte metabólico e instruccional para que el ovocito no cambie de fase dentro del ciclo celular. Los ovocitos que se encuentran dentro de los folículos primordiales son metabólicamente activos. Estos ovocitos responden a las señales de crecimiento intraováricas y comienzan una fase de síntesis activa. Esta fase de crecimiento es única y difiere de las células somáticas en tres aspectos importantes. En primer lugar, a pesar de que el ovocito aumente su tamaño, este proceso tiene lugar en ausencia completa de división celular. Por otra parte, gran parte de los productos procedentes de la transcripción y traducción no se utilizan durante esta fase de crecimiento activo, pero se almacenan para

posterior uso durante la embriogénesis temprana. Por último, la regulación del crecimiento y ciclo celular del ovocito está mediada por una serie de complejas interacciones con las células somáticas que rodean al ovocito. Durante el estadio de folículo primordial, las células que rodean al ovocito probablemente ejercen una influencia negativa en el crecimiento del ovocito. Este efecto negativo desaparece cuando estas células son estimuladas por mecanismos desconocidos y entran en mitosis (Thibault et al., 1987). Por lo tanto, esta cooperación metabólica mediada por el soporte celular es importante para el crecimiento del ovocito.

Modificaciones bioquímicas y morfológicas del ovocito durante la maduración que son desencadenadas por el pico de LH

La maduración ovocitaria está desencadenada por la respuesta folicular al pico preovulatorio de gonadotropinas, que confiere al ovocito la capacidad de sostener la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Durante esta fase de maduración, las células de la granulosa siguen produciendo esteroides, pero tiene lugar el paso de un ambiente estrogénico a otro donde predomina la progesterona. Por otra parte, producen ácido hialurónico que permite la expansión y mucificación de las células del cumulus y pérdida de las uniones tipo gap de contacto entre el ovocito y estas células. El potencial para la maduración nuclear y citoplasmática se adquiere conjuntamente durante el desarrollo del ovocito (Moor et al., 1990; Picton, Briggs, & Gosden, 1998a).

Las interacciones entre las células foliculares y el ovocito son cruciales para el inicio y finalización de esta fase de diferenciación o maduración. Cuando la asociación entre las células foliculares y el ovocito se pierden, aumenta el transporte de membrana y se produce una resituación de organelas citoplasmáticas. Algo del ARNm almacenado durante la fase de crecimiento empieza a transcribirse y las proteínas resultantes juegan un papel crítico en la progresión del ciclo meiótico, en la regulación de la penetración del espermatozoide y en su posterior descondensación.

Por otra parte, durante este estadio de diferenciación, las mitocondrias uniformemente distribuidas en el citoplasma de ovocitos en estadio de GV, se agregan alrededor del núcleo, momento que coincide con la rotura de la vesícula germinal (Thibault et al., 1987). Este agrupamiento mitocondrial y posterior dispersión en estadio de anafase/telofase es microtúbulo dependiente y necesario para la progresión de la maduración.

Mientras que las mitocondrias migran para alcanzar una posición perinuclear durante el periodo de maduración, los gránulos corticales (GC) migran hacia la membrana celular formando una monocapa irregular (Cran & Cheng, 1986). A menudo se forma una zona desprovista de organelas cerca de esta monocapa de gránulos corticales, mientras que una delgada capa de filamentos de actina se interpone entre los GC y el oolema.

Los GC representan una forma especial de lisosomas primarios esféricos, limitados por una membrana, con un tamaño variable y compuestos por glicoproteínas y enzimas hidrolíticas. Se originan a partir del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso, y se forman durante el crecimiento folicular mediante un crecimiento continuo hasta que se produce la ovulación.

Ha sido demostrado que la migración de los GC es un evento necesario para el bloqueo a la polispermia. El desarrollo de la capa de filamentos de actina está probablemente relacionado con la estabilización de los GC, además de ser importantes para su exocitosis. Todavía no está del todo claro por qué una zona desprovista de organelas se forma cerca de esta capa de GC en los ovocitos porcinos. Los ribosomas aumentan en número y el aparato de Golgi se alarga y se transforma en cisternas dilatadas situadas en el córtex del ovocito donde será activo en la exportación de glicoproteínas a la ZP (Picton, Briggs, & Gosden, 1998b) y en la formación de GC necesarios en la fecundación. El retículo endoplasmático también adquiere posición cortical, donde llevará a cabo la liberación de calcio para que se produzca la exocitosis de los GC. También durante la maduración citoplasmática se produce un aumento en la acumulación de lípidos y glutatión (Rodríguez & Farin, 2004).

La remodelación citológica está acompañada de una maduración molecular con síntesis y almacenamiento de una amplia variedad de proteínas durante el crecimiento del ovocito. Se ha visto que esta maduración molecular ocurre unas pocas horas antes de la recogida de ovocitos (en hembras sincronizadas hormonalmente). Se sabe que el ARNm es la forma principal de almacenamiento de información en los ovocitos y éste permanece estable durante días (Brower, Gizang, Boreen, & Schultz, 1981). Durante esta reprogramación, tiene lugar al mismo tiempo nueva síntesis y cese de síntesis de ciertas proteínas específicas del estadio de GV. Estas nuevas proteínas sintetizadas juegan un papel importante en la progresión del ciclo meiótico hasta su finalización, con la formación del pronúcleo femenino.

b. Maduración nuclear

La meiosis es un tipo de división celular característico de las células germinales (espermatogonias y ovogonias). Su objetivo es doble: la reducción de un número diploide de cromosomas a un número haploide y la recombinación de la información genética (Polanski & Zubiak, 1999). Es importante el estudio detallado de estos procesos que tienen lugar en el interior del ovocito para posteriormente, comprender el mecanismo que tiene lugar durante la fecundación.

En la especie porcina, los folículos menores de 0.7mm de diámetro contienen ovocitos incapaces de reanudar la meiosis (R. H. F. Hunter, 1991). La capacidad de desarrollo se incrementa conforme va aumentando el diámetro del folículo (M. G. Hunter, 2000).

Los ovocitos de la mayoría de mamíferos se encuentran en estadio de diplotene de la profase I, hasta que se produce la adecuada estimulación de factores de crecimiento y hormonales dando lugar a la progresión de estos ovocitos al estadio de MII. Posteriormente, éstos quedarán en este estadio de MII hasta que se produzca la fecundación.

Los ovocitos porcinos necesitan de un periodo de síntesis proteica (al que nos hemos referido previamente durante la maduración citoplasmática), anterior a la rotura de la vesícula germinal (GVBD), para una progresión normal en el ciclo meiótico (Fulka Jr, Motlík, Fulka, & Crozet, 1986). La inhibición de la síntesis proteica en diferentes estadios posteriores a la inducción de la maduración en ovocitos porcinos demuestra que las proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular son sintetizadas en suficiente cantidad para que tenga lugar la GVBD a las 12-16h después del pico de LH. Sin embargo, la nueva síntesis proteica no se requiere para la condensación cromatínica o desaparición del nucleolo, pero sí es absolutamente necesaria para la rotura de la membrana nuclear (Kubelka, Motlik, Fulka, Prochazka, & Rimkevičová, 1988).

Adquisición de la competencia meiótica

La adquisición de la capacidad meiótica está asociada con la aparición de componentes esenciales del ciclo celular como el factor promotor de la metafase (Masui & Markert, 1971), una quinasa que se activa en ovocitos completamente desarrollados entre las 8 y 12h después de la inducción de la maduración. El MPF (figura 2) se constituye gracias al ensamblaje de una subunidad reguladora (Ciclina B) y una subunidad catalítica. Esta última es una proteína de 34-kDa denominada p34 cdc2, en la que se lleva a cabo la transferencia de grupos fosfatos del ATP a residuos específicos de serina y treonina, y otra. Esta quinasa es una de las quinasas principales en la regulación de la transición de la fase G2/M durante la mitosis, así como en la meiosis ovocitaria. Los ovocitos porcinos en crecimiento ($\leq 90 \mu\text{m}$ de diámetro) son incapaces de reanudar la meiosis in vitro. Esta incapacidad para reanudar la meiosis no viene dada por una deficiencia en el MPF y/o proteínquinas activadoras de la mitosis (MAP quinasas), ya que la cantidad de las dos subunidades de MPF, p34 cdc2 y la ciclina B en ovocitos en crecimiento es comparable a la existente en ovocitos totalmente desarrollados. Pero estos ovocitos contienen la forma fosforilada de la p34 cdc2, que no permite la activación del MPF hasta que no completen su crecimiento (Christmann, Jung, & Moor, 1994). Posteriormente, cuando los folículos alcanzan un diámetro de 1.0-1.5mm, los ovocitos que han reanudado la meiosis y se encuentran en

estadio de MI, son capaces de activar la subunidad catalítica (cdc2), pero todavía no han establecido una vía MAP quinasa-activadora por lo que no son capaces de proseguir la maduración hasta estadio de MII (Motlik et al., 1984). Por lo tanto, se sabe que la adquisición de la competencia meiótica en ovocitos porcinos se correlaciona con la capacidad para activar a estas dos proteínas, MPF y MAP-quinasas. En primer lugar adquieren la capacidad de activar la subunidad cdc2 y posteriormente la adquieren para activar la vía MAP quinasa durante la fase de crecimiento.

Tinción por el método de Hoechst.

Existen distintos métodos para observar los ovocitos maduros detenidos en la metafase II, el material genético se representa por el corpúsculo polar en el aparato mitótico, donde los cromosomas de algunas especies son visibles por microscopio óptico, en las especies de interés zootécnico no es el caso porque se trabajó con ovocitos porcinos. Una vez extruido el corpúsculo polar los cromosomas migran hacia el centro del ovocito a medida que los ovocitos envejecen. El corpúsculo polar deja la posición de los cromosomas y la maduración se prolonga más de 24 horas. La eficiencia de la enucleación varía entre especies, el alto porcentaje de enucleación permite que los cromosomas sean visualizados en la aspiración del citoplasma. En especies que la metafase no es visible, la enucleación se confirma por medio de la tinción de los ovocitos con fluorocromos específicos para ADN como Hoechst 33342. La exposición de ovocitos a la luz ultravioleta por periodos menos de 10 segundos posee poco o ningún efecto deletéreo en su viabilidad (Palma & Gottfried, 2001).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material de estudio

Las muestras (ovarios) hembras porcinas fueron tomadas en el Camal Municipal de Chachapoyas, que son transportadas al Laboratorio para realizar el trabajo experimental.

4.2. Diseño experimental

El esquema experimental de la investigación se muestra en la figura 4, el esquema muestra cómo se implementó el tratamiento.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se utilizó el método científico como el método general de investigación y como los métodos auxiliares recurrimos al método experimental.

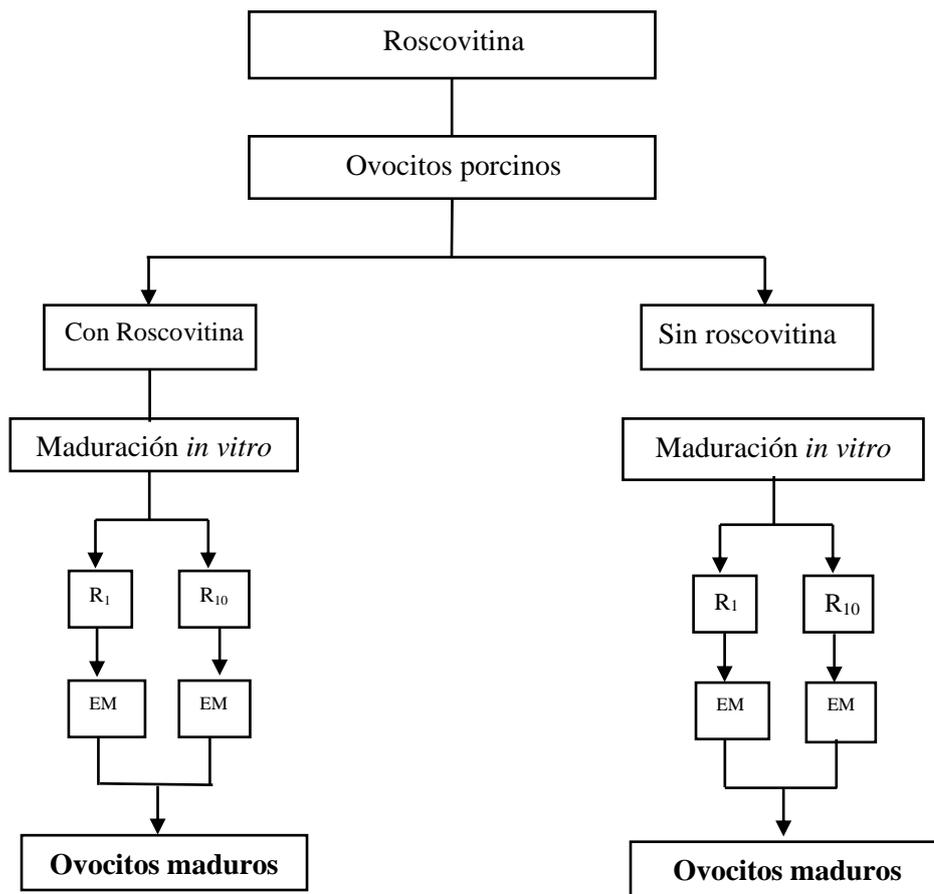


Figura 1. Esquema experimental para la maduración in vitro de ovocitos porcino

Dónde:

R_i: Repeticiones, donde “n” es el número de las repeticiones.

EM: Evaluación de los ovocitos.

4.3. Técnicas

Determinación de ovocitos maduros

4.4. Procedimiento

Recolección de ovarios

Los ovarios fueron recolectados en el Camal Municipal y colocados en medios de solución salina al 0,9% con 1 ml de antibiótico (gentamicina más estreptomicina).

Maduración in vitro (MIV) de ovocitos

Aspiración de folículos

En laboratorio, los ovocitos se lavaron con solución salina, para luego ser aspirados, empleando guantes de látex, jeringa de 10 ml, agujas hipodérmicas N° 18 y papel toalla.

- Para la aspiración, se introdujo la aguja con el bisel hacia arriba y se hizo la punción moviendo la aguja dentro del folículo para liberar las células de la granulosa y no perder ovocitos en el aspirado.
- Los folículos aspirados tuvieron menos de 7 mm, porque mayores a ellos contuvieron dentro del líquido folicular factores de inhibición de la maduración, no aptos para la MIV.
- El líquido aspirado se colocó en tubos falcón de 15 ml con fondo cónico para decantar los ovocitos y sacarlos fácilmente todo el pellet, el tubo fue temperado 37°C.

Selección de ovocitos

- Teniendo el líquido folicular decantado y observando el pellet después de 10-15 min, se retiró todo el sobrenadante dejando en el tubo de 2-3 ml de líquido folicular, luego todo el pellet fue retirado y puesto en una placa de 75 mm, luego el tubo fue lavado con medio de manipulación para evitar las pérdidas de ovocitos.
- Luego se trasladó la placa a un estereoscopio (OLIMPUS SZX16 - Japan) para la selección de los ovocitos.

- Se escogieron los ovocitos buscando que tengan más capas de cumulus (CCO) para una eficiente maduración.
- Los ovocitos escogidos se higienizaron varias veces con el medio de manipulación, colocándolos en placas de 30 mm hasta que estén bien limpios.

Maduración de ovocitos sin roscovitina

- El medio de maduración se introdujo en la incubadora de CO₂, de 2 a 3 horas en placas de 4 well y una placa de 30 mm con el mismo medio para el último lavado.
- Luego de realizar el último lavado, se depositaron en cada well 25 ovocitos, colocándolos lo más juntos posibles, ya que las células del cúmulus segregan factores de maduración lo cual tiene un mejor efecto si estas están más juntas, y por lo general los ovocitos que no tienen buena cantidad de cúmulus son ayudadas por las demás.
- La placa con los ovocitos se introdujo en la incubadora de CO₂ por 24 horas, donde se obtuvo una maduración completa del ovocito.

Maduración con roscovitina

Siguiendo los mismos procedimientos para la maduración sin roscovitina, la placa con los ovocitos se introdujo en la incubadora de CO₂ por 24 horas con 5 µM de roscovitina (pre-maduración), para luego realizar una maduración completa de 28 horas.

Tinción por Hoechst

Se ovocitos son retirados del medio de cultivo, se los transfirió a una placa de Petri con gotas de 50 µl HEPES de trabajo, se adiciona 10 µl de solución Hoechst (10 mg/ml), luego incubarlos a 38,5 °C y 6% CO₂ durante 5 minutos. Se realiza el montaje y se observa en fresco inmediatamente en el microscopio invertido (OLIMPUS Ckx41 - JAPAN), utilizando el objetivo de 40X y el filtro azul. Los núcleos de las ovocitos emitirán fluorescencia azul, se notaran redondos y ubicados al centro de la célula.

4.5. Análisis de datos

Para determinar diferencias entre el grupo con tratamiento y sin tratamiento, se realizó una prueba t de Student para muestras apareadas al 95% de confianza.

V. RESULTADOS

Tabla 1. Número de ovocitos madurados según prueba con y sin tratamientos

N° de Prueba	CON ROSCOVITINA		SIN ROSCOVITINA	
	Ovocitos madurados	% de maduración	Ovocitos madurados	% de maduración
1	24	48.0%	22	44.00%
2	27	54.0%	24	48.00%
3	26	52.0%	23	46.00%
4	24	48.0%	22	44.00%
5	26	52.0%	23	46.00%
6	27	54.0%	23	46.00%
7	25	50.0%	22	44.00%
8	26	52.0%	24	48.00%
9	25	50.0%	23	46.00%
10	26	52.0%	24	48.00%
Promedio	25.6	51.2%	23	46.00%
Total	256		230	

Las diferencias encontradas entre los promedios de ovocitos maduros con y sin tratamiento. Además de mejorar los resultados (valor promedio); en el grupo tratamiento (con roscovitina) se encontró que la desviación estándar es menor; lo que indica que la roscovitina permite que la maduración de los ovocitos sea más homogénea (Tablas 1 y 2).

Tabla 2. Efecto de la roscovitina en la maduración de ovocitos

Grupo	N° Total de ovocitos	Promedio**	Desv. Estándar
Con roscovitina	256	25.6	±1.075
Sin roscovitina	230	23	±2.068

** Diferencias altamente significativas.

El estadístico “T” fue mayor que el valor crítico para uno y dos colas, por lo que se encuentra en la región de rechazo de la hipótesis de igualdad de medias; del mismo modo se tiene p valor inferiores a $sig.=0,01$, por lo que las diferencias de las medias son altamente significativas. Evidenciando un efecto positivo de la roscovitina en la maduración de los ovocitos (Tabla 1).

Los ovocitos obtenidos de ovarios porcinos son madurados mediante in vitro. La maduración consiste en el avance de la división meiótica hasta la metafase II, en este estadio se observa la extrusión del primer cuerpo polar así como la expansión de las células de cúmulus. (Ver figura 2)



Figura 2. Ovocito maduro en el esteroscopio

La tinción de Hoechst tiene la capacidad de unirse a las moléculas de ADN, haciendo que los núcleos y las mitocondrias a aparecer fluorescente bajo luz ultravioleta, se vean redondos y ubicados al centro de la célula. Este protocolo nos permite realizar el conteo y la seguridad de que ovocitos porcinos estén maduros. (Ver figura 3)

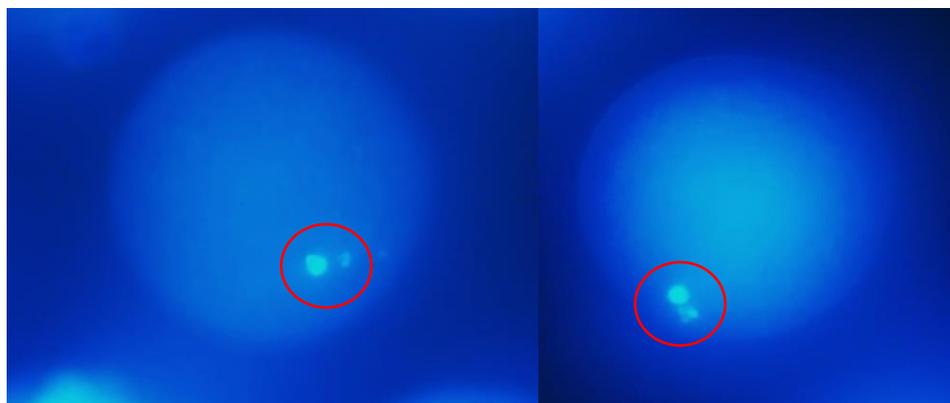


Figura 3. Ovocito maduro observado bajo tinción Hoechst

VI. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron favorables para la maduración de ovocitos porcinos con roscovitina, coincidiendo con Krischek y Meinecke (2001) que el medio de cultivo utilizado es un potente inhibidor del factor promotor de maduración, esto se debe a la condensación previa de la cromatina.

En la investigación realizada por (García, 2005) aplicaron una concentración de 50 μM de roscovitina para la premaduración de ovocitos porcinos, a diferencia de lo que se aplicó en esta investigación, que fue una concentración de 5 μM . Se coincide que, a mayor concentración de roscovitina, el tiempo para la premaduración y maduración es mucho menor, esto se compara con la investigación antes mencionada donde se aplicó una concentración de 50 μM de roscovitina para la premaduración donde se dio en un lapso de 22 horas y en 44 horas se logró madurar los ovocitos porcinos, difiriendo con la concentración que se aplicó en esta investigación que es de 5 μM de roscovitina, donde la premaduración duró 24 horas 48 horas la maduración. (García, 2005) demostró que en ovocitos porcinos la roscovitina a 50 μM durante un periodo de 22 horas es efectivo en el manteniendo de los ovocitos en el estadio de vesícula germinal alcanzando un 85.00% de maduración de ovocitos porcinos, los resultados que se obtuvieron en esta investigación es de 51.20% de maduración de ovocitos porcinos, observando una clara diferencia en las concentraciones aplicadas y los resultados obtenidos, esto se puede deber a muchos factores y uno de ellos puede ser las concentraciones roscovitina que se aplicaron como medio de cultivo.

VII. CONCLUSIÓN

El uso de la roscovitina como inhibidor meiótico influye en el porcentaje de maduración de ovocitos porcinos *in vitro* alcanzando un 51.20% de maduración de ovocitos porcinos y que además de incrementar la cantidad de ovocitos maduros, donde la maduración fue más uniforme comparada a los ovocitos madurados sin roscovitina, obteniendo un porcentaje de maduración superior en 5.2 empleando roscovitina deduciendo también que, a mayor concentración el tiempo de premaduración y maduración es más corto.

VIII. RECOMENDACIONES

Debe realizarse investigaciones que comparen el efecto de la roscovitina con otros inhibidores meióticos.

Estudios futuros debe también enfocarse en la evaluación post maduración, fecundación y desarrollo embrionario de ovocitos tratados con roscovitina.

Utilizar la tinción de Hoeschst para determinar si los ovocitos porcinos son viables y poder realizar el conteo exacto de estos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Barreto, L. S., Caiado, V. S., García, J. M., & Mingoti, G. Z. (2007). Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science*, 99(1-2), 202-207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.06.001>
- Borlaug, N. E. (2002). Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(2), 221–228.
- Brower, P., Gizang, E., Boreen, S., & Schultz, R. (1981). Biochemical studies of mammalian oogenesis: synthesis and stability of various classes of RNA during growth of the mouse oocyte in vitro, 86, 373-388.
- Christmann, L., Jung, T., & Moor, R. M. (1994). MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Molecular reproduction and development*, 38(1), 85–90.
- Coy, P., & Romar, R. (2002). In vitro production of pig embryos: a point of view, 14, 275-286.
- Cran, D. G., & Cheng, W. T.-K. (1986). The cortical reaction in pig oocytes during in vivo and in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 13(3), 241–251.
- Fulka Jr, J., Motlík, J., Fulka, J., & Crozet, N. (1986). Activity of maturation promoting factor in mammalian oocytes after its dilution by single and multiple fusions. *Developmental biology*, 118(1), 176–181.
- Funahashi, H. (2003). Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reproduction, Fertility and Development*, 15, 167-177.

- Funahashi, H., Cantley, T., & Day, B. N. (1994). Different hormonal requirements of pig oocyte–cumulus complexes during maturation in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, *101*(1), 159–165.
- Grimes, R., & Ireland, J. J. (1986). Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*, *35*, 725–732.
- Hansen, P. J. (2006). Realizing the promise of IVF in cattle—an overview. *Theriogenology*, *65*(1), 119–125.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.019>
- Hendriksen, P. J., Vos, P. L., Steenweg, W. N., Bevers, M. M., & Dieleman, S. J. (2000). Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology*, *53*, 11–20.
- Hunter, M. G. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction*, *5*(2), 122–130.
- Hunter, R. H. F. (1991). Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Molecular reproduction and development*, *29*(4), 385–391.
- Jewgenow, K., Heerdegen, B., & Müller, K. (1999). In vitro development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular wall atresia. *Theriogenology*, *51*(4), 745–756.
- Kane, M. T. (2003). A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Animal Reproduction Science*, *79*(3–4), 171–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00164-7)
- Krischek, C., & Meinecke, B. (2001). Roscovitine, a specific inhibitor of cyclin-dependent protein kinases, reversibly inhibits chromatin condensation during

- in vitro maturation of porcine oocytes. *Zygote*, 9(4), 309-3016.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0967199401001356>
- Kubelka, M., Motlik, J., Fulka, J., Prochazka, R., & Rimkevičová, Z. (1988). Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Molecular Reproduction and Development*, 19(4), 423–431.
- Lagutina, I., Ponderato, N., Lazzari, G., & Galli, C. (2004). Kinetics of Oocyte Maturation and Subsequent Development of IVF, Parthenogenetic, and NT Bovine Embryos after Meiotic Inhibition with Roscovitine. *Cloning and Stem Cells*, 4.
- Lonergan, patrick, Faerge, I., Maddox, P., Boland, M., & Fair, T. (2003). Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. *Molecular Reproduction and Development*, 64, 369-378. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.10206>
- Marchal, R., Tomanek, M., Terqui, M., & Mermillod, P. (2001). Effects of cell cycle dependent kinases inhibitor on nuclear and cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 60, 65-73.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.1062>
- Markstrom, E., Svensson, Ec., Shao, R., Svanberg, B., & Billig, H. akan. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis–dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123(1), 23–30.
- Masui, Y., & Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 177(2), 129–145.

- Mattioli, M., Galeati, G., & Seren, E. (1988). Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Molecular Reproduction and Development*, 20(2), 177–183.
- Mermillod, P., Oussaid, B., & Cognié, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 1*, 449-460.
- Moor, R. M., Mattioli, M., Ding, J., & Nagai, T. (1990). Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility, supplement 40*, 197-210.
- Motlik, J., Crozet, N., & Fulka, J. (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of reproduction and fertility*, 72(2), 323–328.
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998a). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and cellular endocrinology*, 145(1-2), 27–37.
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998b). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and cellular endocrinology*, 145(1-2), 27–37.
- Polanski, Z., & Zubiak, J. Z. (1999). *Encyclopedia of reproduction*. San Diego: Academic Press.
- Rodríguez, K. F., & Farin, C. (2004). Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, 16, 55-67.
- Staigmiller, R. B., & Moor, R. M. (1984). Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Molecular Reproduction and Development*, 9(2), 221–229.
- Sun, Q.-Y., Lai, L., Wu, G.-M., Park, K.-W., Day, B. N., Prather, R. S., & Schatten, H. (2001). Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol:

- Correlation with chromosomes, γ -tubulin, and MAP kinase. *Molecular reproduction and development*, 60(4), 481–490.
- Thibault, C., Szöllösi, D., & Gérard, M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Développement*, 27(5), 865–896.
- Urrego, R., & Restrepo, G. (2006). Implicaciones de biotecnología reproductiva en la producción animal. *Revista CES/Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2, 64-78.
- Vivanco, H. (2007). *Situación y proyección de la ganadería peruana. Mejoramiento genético y reproducción animal Perú*. Lima.
- Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M., & Pursel, V. G. (1993). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biology of Reproduction*, 49(1), 89–94.
- Yoshida, M., Ishigaki, K., & Pursel, V. G. (1992). Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Molecular reproduction and development*, 31(1), 68–71.
- Zhang, M., Zhang, C., Pan, L., Gong, S., Cui, W., Yuan, H., ... Tan, J. (2007). Meiotic arrest with roscovitine and follicular fluid improves cytoplasmic maturation of porcine oocytes by promoting chromatin de-condensation and gene transcription. *Scientific Reports*, 7(11574). Recuperado a partir de <https://www.nature.com/articles/s41598-017-11970>

X. ANEXOS

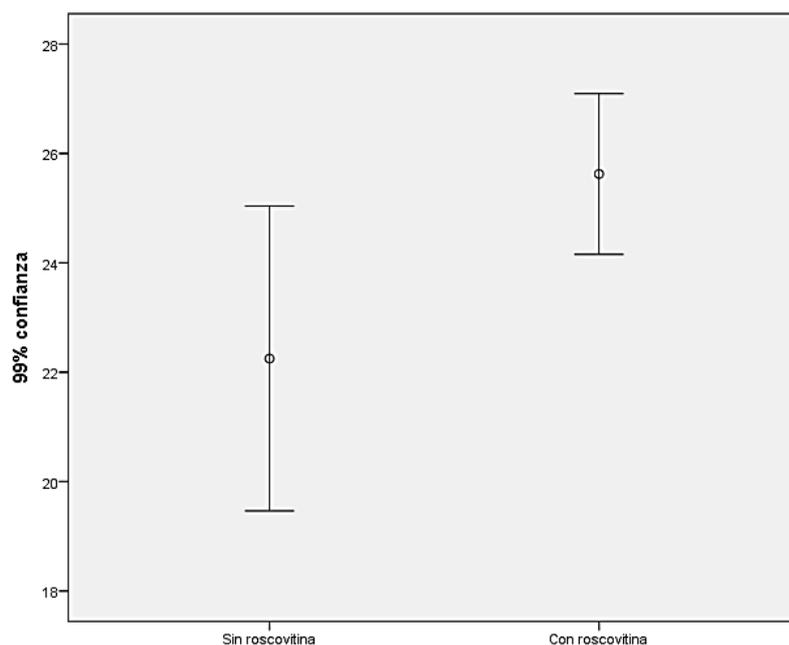


Figura 4. Distribución de medias y errores de los resultados

Tabla 3. Prueba T para muestras apareadas

	<i>CON</i> <i>ROSCOVITINA</i>	<i>SIN</i> <i>ROSCOVITINA</i>
Media	25,625	23.0
Varianza	1,410714286	5,071428571
Observaciones	10	10
Coefficiente de correlación de Pearson	0,734378527	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	7	
Estadístico t	5,973718665	
P(T<=t) una cola	0,000278340	
Valor crítico de t (una cola)	1,894578605	
P(T<=t) dos colas	0,000556681	
Valor crítico de t (dos colas)	2,364624252	

PANEL FOTOGRÁFICO

Protocolo para la maduración de ovocitos *in vitro*.



Figura 5. Protocolo para la maduración de ovocitos *in vitro*

- A: Corte ovarios del utero de cerda
- B: Almacenamiento y transportes de ovarios en solución salina (38°C)
- C: Puesta de ovarios en baño maria
- D: Aspiración folicular de ovarios
- E: Líquido folicular aspirado
- F: Rayado placa petri para facilitar la búsqueda de ovocitos

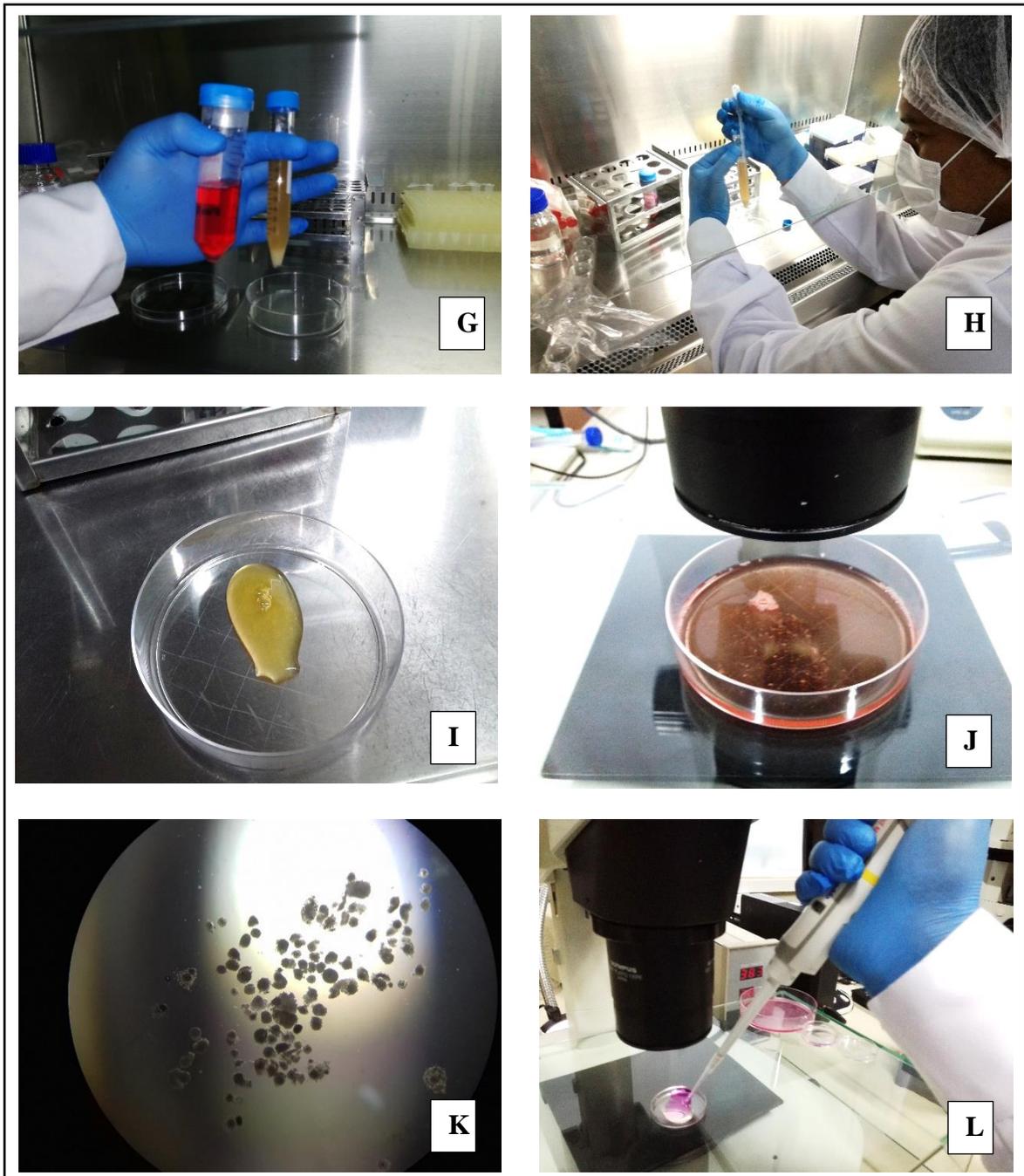


Figura 6. Protocolo para la maduración de ovocitos in vitro: selección de ovocitos

- G:Medición de medio de manipulacion
- H:Extraccion del sedimento de liquido folicular
- I:Sedimento líquido folícular
- J:Busqueda de ovovitos en el Estereoscopio
- K:Ovocitos encontrados
- L:Selección de ovocitos

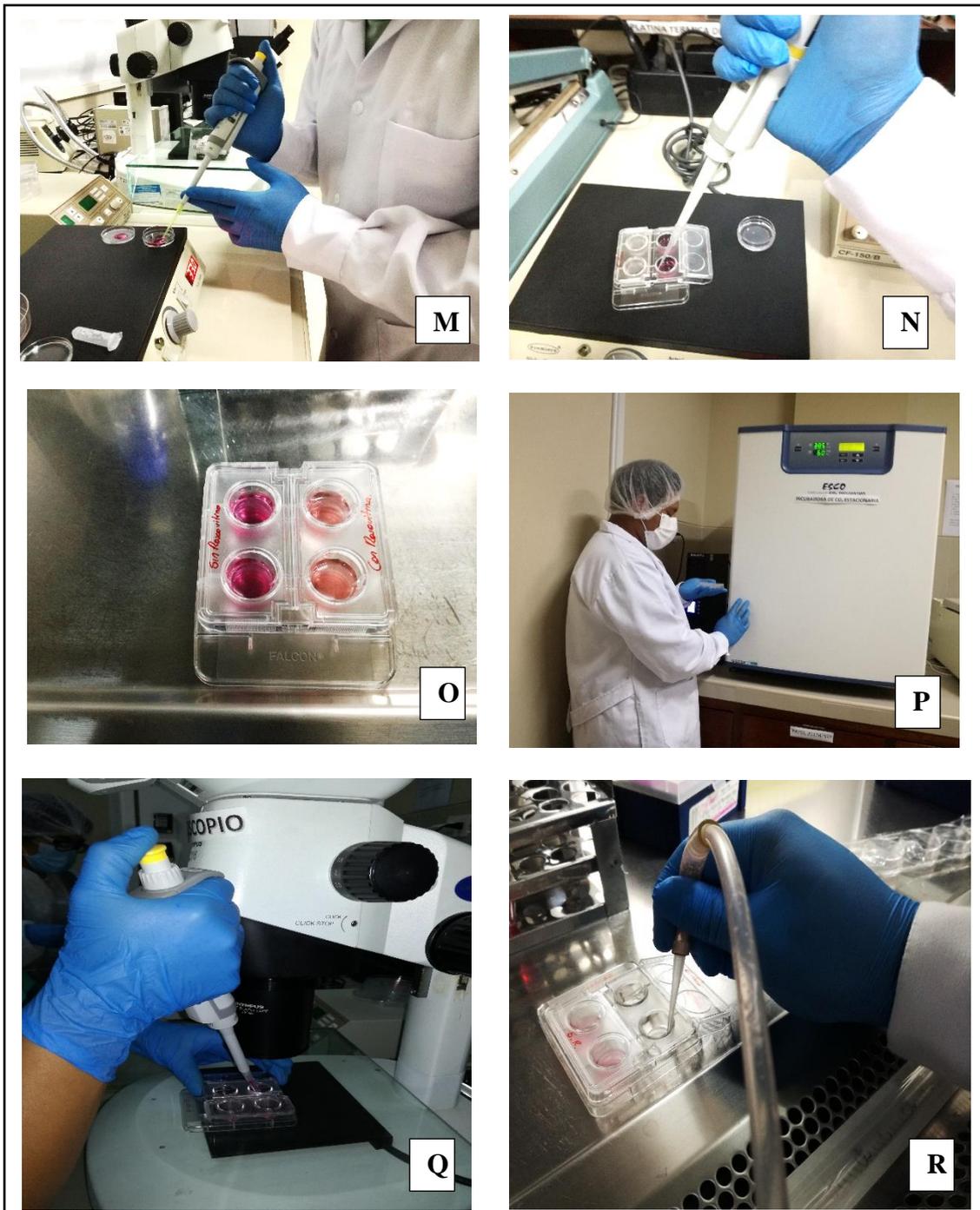


Figura 7. Protocolo para la maduración de ovocitos in vitro: Selección de ovocitos pre madurados con tratamiento

M: Enjuague de los ovocitos viables con medio de maduración

N: Colocación de ovocitos en la placa de 4 well que contiene medio de maduración

O: Rotulación de placa Well

P: Llevado de la placa a la incubadora para su respectiva maduración.

Q: Selección de ovocitos pre-madurados con roscovitina a las 24 hrs.

R: Cambio de medio a ovocitos Pre-madurados con roscovitina a medio de maduración

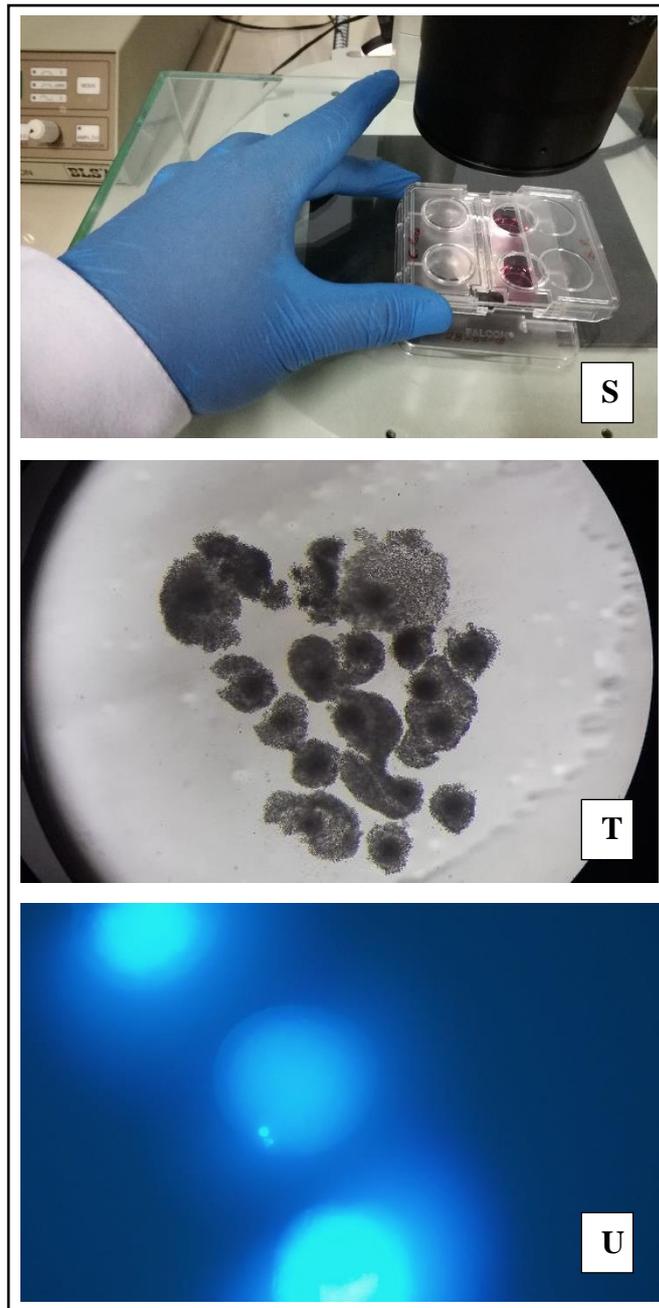


Figura 8. Maduración de ovocitos

S: Observación de ovocitos cumplido el tiempo de maduración (48 horas)

T: Vista de los Ovocitos maduros en el estereoscopio

U: Ovocitos maduros observados bajo tinción Hoeschst