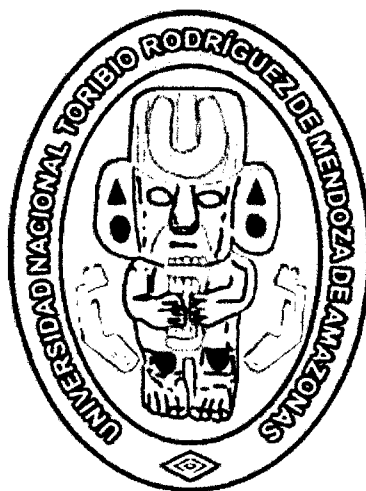


**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS**

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

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA



**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE
MADURACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO
DE OVOCITOS BOVINOS EXTRAÍDOS DE
FOLÍCULOS DE TRES DIÁMETROS DIFERENTES.**

Tesis para optar el título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Bch. GLENI TATIANA SEGURA PORTOCARRERO

CHACHAPOYAS – PERÚ

2016

DEDICATORIA

A Dios ante todo

A mi madre que es mi principal motivo de superación, por su cariño incondicional, su apoyo en los momentos difíciles y por haberme dado la vida.

A mi novio jenin por su apoyo incondicional, su cariño y su confianza, que me da la fuerza para tener éxito en mi vida personal y profesional.

A mis hermanos mayores (Llique, Jheyner y Oimer) por su apoyo emocional y depositar su confianza en mí.

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera agradecer en primera instancia a Dios.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza por mi formación profesional y por haberme permitido realizar con éxito esta tesis.

Al rector de esta casa Universitaria el PhD. Jorge Luis Maicelo Quintana por las facilidades brindadas en mi educación mediante el mejoramiento de las infraestructuras de la universidad y la creación de nuevos pabellones y de laboratorios que fortalecieron mis conocimientos.

A la facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología por la excelente formación académica y profesional.

Al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología por el apoyo en el financiamiento para la realización de mi tesis.

A mi Asesor y Co-asesor: PhD. Ilse Silvia Cayo Colca y Blgo. Jenin Víctor Cortez Polanco, por haber depositado toda su confianza, apoyo incondicional y paciencia para que este proyecto se llevara a cabo.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

PhD. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES
VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. MARÍA NELY LUJÁN ESPINOZA
VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Mg. ELIAS ALBERTO TORRES ARMAS
**DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA**

VISTO BUENO DEL ASESOR

Yo, PhD. Ilse Silvia Cayo Colca, identificado con DNI N° 09820879, docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, asesor de la tesis:

“Evaluación *in vitro* de la capacidad de maduración y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos extraídos de folículos de tres diámetros diferentes”, presentado por:

Bach. GLENI TATIANA SEGURA PORTOCARRERO

Habiendo revisado el informe final de la tesis en mención, doy la conformidad y el visto bueno para continuar con sus trámites correspondientes.



PhD. ILSE SILVIA CAYO COLCA
ASESOR


VISTO BUENO DEL JURADO



Mv. NILTON LUIS MURGA VALDERRAMA
PRESIDENTE



Ing. NELSON OSWALDO PAJARES QUEVEDO
SECRETARIO



Ing. WIGOBERTO ALVARADO CHUQUI
VOCAL



URIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

FACULTAD DE INGENIERIA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGIA.

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chachapoyas, el día 18 de ENERO del año 2016, siendo las 11 horas, se reunieron los integrantes del Jurado conformado por:

Presidente: M.V. NILTON LUIS MURBA VALDERAMA.

Secretario: Ing. NELSON OSWALDO PAJARES QUEVEDO

Vocal: Ing. WIGOBERTO ALVARADO CHUQUI

para evaluar la Sustentación del Informe de Tesis presentado por el(la) bachiller, don(ña) GLENI TATIANA SEGURA PORTOCARRERO, titulado EVALUACION IN VITRO DE LA CAPACIDAD DE MADURACION Y DESARROLLO EMBRIONARIO DE OVOCITOS BOVINOS EXTRAIDOS DE FOLICULOS DE TRES DIAMETROS DIFERENTES.

Después de la sustentación respectiva, el Jurado acuerda la APROBACIÓN (X), DESAPROBACIÓN () por mayoría (), por unanimidad (X); en consecuencia, el (la) aspirante puede proseguir con el trámite subsiguiente, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la UNAT-A.

Siendo las 12:15 horas del mismo día, el Jurado concluye el acto de sustentación del Informe de Tesis.


SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL

Form6- T

ÍNDICE GENERAL

	Pag
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
AUTORIDADES UNIVERSITARIAS	iii
VISTO BUENO DEL ASESOR	iv
VISTO BUENO DEL JURADO	v
COPIA DE ACTA DE SUSTENTACIÓN	vi
ÍNDICE	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
III. MARCO TEÓRICO	2
3.1. Antecedentes de la investigación	2
3.2. Bases teóricas	3
3.2.1. Producción <i>in vitro</i> de embriones	3
3.2.1.1. Obtención de ovocitos	4
3.2.1.2. Maduración <i>in vitro</i>	4
3.2.1.3. Fecundación <i>in vitro</i> de ovocitos maduros	5
3.2.1.4. Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	5
3.2.2. Foliculogénesis	6
3.2.2.1. Formación de los ovocitos	7
3.2.3. Maduración del ovocito	8
3.2.3.1. Maduración citoplasmática	8
a) Redistribución de organelas citoplasmáticas	8
b) Dinámica de los filamentos del citoesqueleto	9
3.2.3.2. Maduración nuclear	9
3.2.4. La fecundación	10

3.2.4.1. Interacción del espermatozoide y el ovocito	11
a) Denudación del ovocito	12
b) Penetración del espermatozoide	12
c) Reacción acrosómica	13
d) Fusión de gametos	14
3.2.5. Segmentación embrionaria	17
a) Formación del blastocisto	18
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	20
4.1. Ubicación	20
4.2. Material biológico	20
4.2.1. Aspiración, medición y selección de los complejos ovocito-cúmulus	20
4.2.2. Maduración <i>in vitro</i> de los complejos ovocito-cúmulus	21
4.2.3. Fertilización <i>in vitro</i> de los complejos ovocito-cúmulus	24
4.2.4. Cultivo <i>in vitro</i> de los cigotos	26
4.3. Análisis estadístico de los resultados	28
V. RESULTADOS	28
VI. DISCUSIÓN	31
VII. CONCLUSIONES	32
VIII. RECOMENDACIONES	32
IX. BIBLIOGRAFIA	33
X. ANEXOS	37

LISTA DE FIGURAS

	pag
Figura 1. Ovocito eclosionado	12
Figura 2. Reacción acrosómica del espermatozoide	14
Figura 3. Fecundación	15
Figura 4. Diagrama de la fusión de las membranas del espermatozoide y oolema.	16
Figura 5. Categorización embrionaria	19
Figura 6. Categorización de los ovocitos	21
Figura 7. Maduración nuclear	23
Figura 8. Maduración del ovocito	25
Figura 9. Blastocitos	27
Figura 10. Gráfico de comparación entre diámetro folicular y diámetro de ovocito.	29

LISTA DE TABLAS

	pag
Tabla 1. Relación entre el diámetro folicular, categoría de los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) y diámetro del ovocito	28
Tabla 2. Competencia meiótica de los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) según diámetro folicular.	29
Tabla 4. Segmentación embrionaria post 18h de fecundación de los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) según diámetro folicular.	30
Tabla 3. Desarrollo embrionario	30

INDICE ABREVIATURAS

- SFB: Suero fetal bovino.
BSA: Suero de albumina bovina.
MIV: Maduración *in vitro*
FIV: Fecundación *in vitro*.
CIV: Cultivo *in vitro*
FSH: Hormona folículo estimulante. .
LH: Hormona luteinizante
SOF: Fluido sintético de oviducto
OPU: de las siglas en inglés de Ovum Pick Up.
ZP: Zona pelúcida
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
GV: Vesícula germinal.
RA: Reacción acrosómica
TE: Epitelio exterior trofoectodermo
MCI: Masa celular interna
COCs: Complejos ovocito-cúmulus
TCM: Medio de cultivo tisular
EGF: Factor de crecimiento epidermal
MII: Metafase II

RESUMEN

Se sabe que el diámetro folicular está relacionado con la producción de embriones *in vitro*. Nuestro trabajo, tuvo como objetivo evaluar la capacidad de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos extraídos de folículos de tres diámetros diferentes (1-2mm, 3-4mm y 5-6mm). Para ello, se colectaron ovarios de camal y se aspiraron ovocitos por cada diámetro folicular. Los primeros 30 ovocitos de cada diámetro folicular se utilizaron para determinar el diámetro de los ovocitos. El siguiente grupo fue madurado *in vitro* por 24 horas en una atmósfera humidificada, 5% CO₂ y 38.5°C. Un último grupo fue madurado y fertilizado *in vitro* por 24 horas y 18 horas respectivamente, en atmósfera humidificada y 5% CO₂ a 38.5°C y cultivados en mezcla de gases por siete días. Posteriormente, se realizó un ANEVA para identificar diferencias estadísticas durante la maduración y el desarrollo embrionario *in vitro*, por grupo de diámetro folicular. La prueba tukey se usó para evaluar entre cada par de grupos promedios de los ovocitos maduros y embriones. Se encontraron diferencias significativas, ya que los del rango folicular 1-2mm y 3-4mm presentaron mayor porcentaje de maduración, sin embargo en producción de embriones *in vitro* se obtuvo mayor porcentaje en los ovocitos de los diámetros foliculares de 3-4m y 5-6mm. En conclusión, se demostró que no existe relación entre el diámetro del ovocito y el diámetro folicular, además los ovocitos de folículos de 1-2 y 3-4mm presentaron mayor competencia meiótica. Sin embargo, los que presentaron mayor desarrollo embrionario fueron los ovocitos de folículos de 3-4mm y 5-6mm.

ABSTRACT

In our work, we aimed to evaluate the meiotic and developmental competence of oocytes obtained from three different follicular diameters (1-2mm, 3-4mm and 5-6mm). Therefore, oocytes from bovine ovaries from a local abattoir were aspirated. The first group of oocytes (1-2mm, 3-4mm and 5-6mm) was used to evaluate their diameter. The second group was matured *in vitro* for 24 hours in a humidified atmosphere, 5% CO₂ and at 38.5 °C. The third group was matured and fertilized *in vitro* for 24 hours and cultured for seven days. An ANOVA was used to identify statistical differences during maturation and embryo production. Tukey was used to evaluate the differences during meiotic and developmental competence of each group. We found statistical differences during meiotic competence between 1-2mm and 3-4mm group. However, we encountered that 3-4mm and 5-6mm group got statistical higher *in vitro* embryo production. In conclusion we demonstrated that there is no relation between the oocytes and follicular diameter. Moreover, oocytes from 1-2mm and 3-4mm had the highest meiotic competence and oocytes from 3-4mm and 5-6mm had the highest developmental rates.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel nacional es urgente que la ganadería siga desarrollándose para tratar de disminuir la importación de alimentos pecuarios, mejorar el ambiente social y económico en las comunidades campesinas y capitales provinciales. Ya que si estos sectores son orientados correctamente pueden llegar a producir varias líneas para exportación. (Vivanco, 2007).

Con el constante aumento de la población mundial y las deficiencias nutricionales en muchas partes del mundo la biotecnología reproductiva es una herramienta que podría ser la clave para el desarrollo agropecuario y poder generar la suficiente cantidad de alimento para cubrir las necesidades de una población en constante crecimiento (Urrego y Restrepo, 2006).

En la actualidad la producción de embriones *in vitro* ha dado lugar a un aumento considerable en la transferencia de embriones de vacunos producidos con esta técnica. Las biotecnologías son consideradas una herramienta muy importante en la conservación y mejoramiento genético de animales, entre las que destacan; maduración, fecundación y cultivo *in vitro* (MIV, FIV y CIV, respectivamente). Otras de las aplicaciones de la fecundación *in vitro* en bovinos es que permite obtener embriones a muy bajo costo y de animales enfermos o de avanzada edad. Esta técnica ha sido usada como herramientas para hacer más eficiente el uso del pool de ovocitos existentes en el ovario de los bovinos; debido a que del total de ovocitos en estado de quiescencia, menos del 1% llegan a generar un ternero nacido. Más aún, las tasas de embriones logrados con las herramientas *in vitro*, aún continúan siendo bajas.

La obtención *in vitro* de embriones generalmente se ha logrado a partir de folículos de 1-8mm en diámetro (Yang *et al.*, 1998). En suma a ello, investigaciones reportan que los ovocitos adquieren la competencia meiótica cuando alcanzan diámetros superiores a 110µm, correspondiente a diámetros foliculares entre 2-3mm (Crozet *et al.*, 1981). Sin embargo, la caracterización de los ovocitos por cada diámetro folicular, así como su competencia meiótica y el potencial de desarrollo embrionario, requieren ser investigados a mayor profundidad.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad de maduración y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos extraídos de folículos de tres diámetros diferentes (1-2mm, 3-4mm y 5-6mm).

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general: evaluar la capacidad de maduración y desarrollo embrionario de ovocitos obtenidos de folículos de tres diámetros diferentes en bovinos.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos de folículos de tres diámetros foliculares diferentes.
- Determinar la tasa de división celular de ovocitos de folículos de tres diámetros foliculares diferentes.
- Identificar el diámetro folicular recomendable para la producción de embriones *in vitro* en bovinos.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes de la investigación

Estudios relacionan la calidad del ovocito con el número de capas de las células de cúmulus. Lonergan *et al* (1994); obtuvieron mayor porcentaje de blastocistos a partir de ovocitos con mayor capas de células de cúmulus, los cuales fueron extraídos de folículos mayores a 6mm en comparación con folículos de 2-6mm. Por otro lado, también fue demostrado que los folículos mayores a 4mm tenían mayor potencial de desarrollo embrionario. También se ha determinado que mientras más grande sea el diámetro folicular mejor será la competencia meiótica y el desarrollo embrionario (Lonergan *et al.*, 1994; Blondin y Sirard, 1995). Sin embargo, existe poca información que relaciona el diámetro folicular (1-2mm y 3-4mm) con la capacidad de maduración y desarrollo embrionario *in vitro*.

Según Sirard *et al* (1992); los ovocitos utilizados en la maduración *in vitro* se extraen preferentemente de folículos con un diámetro de 2-6mm. Tan y Lu (1990), demostraron que los ovocitos obtenidos de folículos mayores a 6 mm de diámetro poseían mayor porcentaje de desarrollo embrionario en categoría

de blastocistos, lo cual fue corroborado por McCaffrey *et al.*, 1992, quien observó en su investigación que los ovocitos obtenidos de folículos de 6-8mm de diámetro tenían mejor potencial de desarrollo embrionario que los ovocitos de folículos menores a 6mm. Sin embargo, aún no hay información disponible que caractericen a ovocitos provenientes de folículos de diámetros menores a 3mm.

3.2. Bases teóricas

3.2.1. Producción *in vitro* de embriones

El nacimiento del primer bovino producido *in vitro* en 1981 permitió que la técnica de fertilización *in vitro* comenzara a ser reconocida a nivel mundial. No obstante su complejidad hace que sea una metodología aun limitada en el ámbito experimental. Conjuntamente a ello los elevados costos en la década de los 80 y 90's restringía su aplicación de manera comercial (Viana y Camargo, 2007).

La producción de embriones a través de la Fertilización *in vitro* (FIV) se realiza dentro de un laboratorio, donde el ovocito pasa por un proceso de maduración para luego ser expuesto a espermatozoides previamente capacitados para que se produzca la fecundación proveyendo las condiciones adecuadas que simulen el proceso que se da de manera natural (Lorenzo, 1994). El propósito de realizar FIV es la producción de embriones en estadios de mórula y blastocisto para luego transferirlos a las vacas receptoras (Quintana *et al.*, 2012). Recalcando que la eficiencia de esta técnica es significativamente menor que la obtenida de forma natural. La FIV tiene ventajas y desventajas entre las que se puede destacar:

Ventajas:

- Te permite evaluar eficientemente la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos.

- Prolongar la vida reproductiva de los animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos.
- Creación de bancos de gametos provenientes de animales seleccionados por excelencia productiva y/o adaptabilidad.
- Determinación y selección del sexo de los embriones bovinos.
- Obtención de descendientes de vacas de alto valor genético que deban ser sacrificadas por sufrir enfermedades, infertilidad, por su edad.

Desventajas:

- Bajo porcentaje de producción de embriones transferibles (30 y 40%) en comparación con los embriones producidos de manera natural.
- La calidad de los embriones producidos *in vitro* es inferior a la calidad de embriones obtenidos *in vivo*.
- Baja resistencia a la Criopreservación, obstaculizando su conservación a tiempos indefinidos.
- Presencia del síndrome de exceso de volumen fetal que consiste en el nacimiento de terneros muy voluminosos, con anomalías estructurales y funcionales que provocan una mayor porcentaje de mortalidad.
- Aumento del porcentaje de partos distócicos causados por el exceso de volumen fetal.

3.2.1.1. Obtención de ovocitos

Los ovocitos son extraídos de folículos con diámetro entre 2 a 8mm a través de la aspiración folicular, se coge estos diámetros porque poseen buen porcentaje de desarrollo embrionario a comparación de ovocitos extraídos de folículos menores de 2mm (García y Martínez, 2013). Después de obtener los ovocitos se seleccionan tomando en cuenta tres criterios; el diámetro de los ovocitos, el aspecto de su citoplasma y las características de las células del cúmulus que lo rodea. (Liebfried y First, 1979; Sato *et al.*, 1990).

3.2.1.2. Maduración *in vitro*

El objetivo es la maduración de los ovocitos, este proceso es de gran importancia en la producción de embriones *in vitro*; porque si no se dan las condiciones adecuadas el ovocito no madurara y por tanto no podrá ser fecundado (Gilchrist y Thompson, 2007).

La evaluación de la maduración de los ovocitos se da mediante la observación de algunas características como son la expansión de las células del cúmulus y le presencia del corpúsculo polar, otro factor importante para la maduración es el medio de cultivo, ya que este debe proveer fuentes energéticas, proteicas, minerales, antibióticas y hormonales para un buen desarrollo de los ovocitos (Memili *et al.*, 2007). Otro factor importante que se debe tomar en cuenta son las condiciones fisicoquímicas como lo son la temperatura, pH, presión osmótica y la composición atmosférica para simular el ambiente natural en el oviducto (Yang *et al.*, 1998).

3.2.1.3. Fecundación *in vitro*

La fecundación consiste en unir e incubar en un medio suplementado con fuentes energéticas y proteicas, ovocitos maduros con espermatozoides móviles y capacitados por un periodo entre 6 a 24 horas. La capacitación espermática se realiza mediante la exposición de espermatozoides vivos a concentraciones de heparina y cafeína, entre otras. A través de estas sustancias el espermatozoide logra capacitarse para poder interactuar y fecundar el ovocito de manera satisfactoria (Hernández, 2005).

Para lograr la capacitación y reacción del acrosoma del espermatozoide a través del pasaje de las barreras del ovocito, el semen debe pasar por un proceso en el cual eliminara elementos presentes como el plasma seminal, componentes del diluyente en caso de semen congelado-descongelado, contaminantes, excluyendo a los espermatozoides, los cuales a través de este proceso también se seleccionaran aquellos que estén vivos y con mejor motilidad. Este proceso consiste en la centrifugación en gradientes de densidad (percoll) (Peláez, 2011).

3.2.1.4. Cultivo de embriones *in vitro*

El cultivo de embriones se basa en el uso de diferentes medios para el desarrollo de las primeras etapas embrionarias. De acuerdo a sus características, los cultivos se clasifican en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y co-cultivo con células somáticas; semidefinidos cuando se omite el cocultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona (Herradón *et al.*, 2007). Sin embargo, los medios simples más utilizados para el cultivo de los embriones bovinos son: el fluido oviductal sintético, con base a los componentes encontrados en el fluido oviductal bovino, y el medio KSOM (Liu y Foote, 1995), ayudando así a que cada vez más se vaya buscando componentes para la eficaz nutrición de los embriones. Recordando que estos medios todavía necesitan ser mejorados sensiblemente, puesto que el cultivo de los embriones producidos *in vitro* en el interior del oviducto incrementa notablemente la calidad de los mismos.

3.2.2. Foliculogénesis

En la foliculogénesis se da la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa como de la teca. El desarrollo de los folículos antrales necesita esencialmente para su desarrollo las gonadotropinas FSH y LH. En el caso del ganado vacuno el crecimiento del folículo antral se da en una oleada, con un patrón de 2 a 3 ondas por ciclo en el ganado vacuno. Las ondas son provocadas por un aumento transitorio de concentraciones de FSH, las cuales originan el crecimiento significativo de las células de la granulosa, aumentan la producción de estradiol y la expresión de receptores de LH (Ryan *et al.*, 2008). Los folículos son la unidad esencial del ovario ya que contienen los ovocitos que llegarán a ovular y posteriormente se fertilizarán para dar origen a un embrión. Estos también proveen esteroides y hormonas necesarias en el mantenimiento del ciclo ovárico y la preparación del útero para el proceso de implantación del embrión. (Findlay *et al.*, 2009).

El proceso de foliculogénesis bovina se presenta durante los períodos prepuberal, puberal, anestro postparto, ciclo estral y primeros meses de gestación. La foliculogénesis es un proceso dinámico caracterizado por una proliferación acelerada y una diferenciación de las células somáticas que componen el folículo. (Henaó y Trujillo, 2000)

A través de la foliculogénesis se obtiene el folículo preovulatorio o de De Graff el cual se forma a partir de folículos primordiales. El inicio de este proceso comienza en la vida fetal, donde se produce la reserva de folículos primordiales y ya cuando el animal es mayor se necesitan meses para que un folículo primordial se transforme en un folículo de De Graff. (Palma, 2001).

3.2.2.1. Formación de los ovocitos

El origen de las células germinales primordiales es a partir del endodermo del saco vitelino. Luego de su origen proliferan y migran hacia las crestas genitales que se encuentran ubicadas en el mesonefros del embrión donde son diferenciadas en ovogonias y continúan proliferando formando grupos, los cuales son rodeados por células procedentes del mesonefros formando los cordones sexuales primitivos. En el transcurso de la vida fetal del bovino cerca de los 80 días de gestación, las ovogonias van dejando su ciclo mitótico para ingresar en la profase I de la meiosis, convirtiéndose en ovocitos primarios (Byskov and Hoyer, 1994; Russe, 1983). La profase I de la meiosis se divide en cinco etapas: leptonema, cigonema, paquinema, diplonema y diacinesis. Durante la etapa de leptonema los cromosomas se condensan formando filamentos delgados. Esto se debe a que la meiosis se inicia después de un periodo de síntesis de ADN, donde los cromosomas contienen dos cromátidas hermanas. En el cigonema se inicia la unión de los cromosomas homólogos para la formación del complejo sinaptonémico. Esta unión finaliza en el paquinema, donde también se produce la condensación y acortamiento de los cromosomas. En este período los cromosomas homólogos están íntimamente unidos. En la etapa del diplonema los cromosomas homólogos comienzan a separarse. Ya en esta parte la meiosis se detiene y los cromosomas se descondensan permitiendo la síntesis de ARN. En este estadio, conocido como

vesícula germinal (GV), la meiosis es paralizada hasta que el ovocito inicie la etapa de maduración.

Por mucho tiempo se pensó que el ovario de un mamífero poseía una población definida de ovocitos al nacimiento y que se iba reduciendo en el transcurso de su vida sin poder renovarse. En los bovinos se calculó una población de 135.000 ovocitos al nacimiento (Erickson, 1966b). No obstante esta creencia fue cuestionada durante los últimos años desde la publicación sobre la existencia de células madre germinales en ovarios de mamíferos adultos que permitirían la renovación folicular (Johnson *et al.*, 2004; Tilly and Telfer, 2009).

3.2.3. Maduración del ovocito

A través de la hormona luteinizante (LH), las células de la granulosa estimulan la secreción de factores parecidos al factor de crecimiento epidérmico (EGF) los cuales darán la señal a las células de la granulosa del cúmulo para que inicie de la maduración (Conti *et al.*, 2006).

Para que se dé la maduración del ovocito primero este debe pasar por dos eventos que son la maduración citoplasmática y la maduración nuclear.

3.2.3.1. Maduración citoplasmática

La maduración citoplasmática se realiza mediante la redistribución de las organelas citoplasmáticas, los cambios en la dinámica de los filamentos del citoesqueleto (Ferreira *et al.*, 2009).

a) Redistribución de organelas citoplasmáticas

En el proceso de la maduración las mitocondrias cambian de lugar desde una posición periférica a una distribución englobando todo el citoplasma. Iniciando la maduración del ovocito se produce un aumento en la cantidad de ribosomas y la síntesis de proteínas.

Cuando el ovocito se encuentra en estadio de GV el retículo endoplásmico se encuentra distribuido de manera uniforme en el citoplasma, pero ya finalizando la maduración este toma una posición en la zona cortical, incrementando su sensibilidad para la liberación de Ca^{2+} que sucede en el proceso de fecundación y el cual estimula el inicio del desarrollo embrionario.

El aparato de golgi deriva a las organelas que se denominan gránulos corticales los cuales se encuentran presentes solamente en ovocitos, distribuidos en el citoplasma y durante el proceso de maduración se relocalizan en la zona cortical. Al momento en el que el espermatozoide entra en el citoplasma de ovocito el retículo endoplásmico libera Ca^{2+} que produce la excitación de los gránulos corticales produciendo cambios en la zona pelúcida que evitan la polispermia. La polispermia es la entrada de más de un espermatozoide en el ovocito y causa alteraciones cromosómicas que no permiten el desarrollo embrionario.

b) Dinámica de los filamentos del citoesqueleto

El citoesqueleto está formado por diversidad de filamentos dentro de los cuales se encuentran los microtúbulos, los filamentos de actina y los filamentos intermedios los cuales son responsables de la segregación de los cromosomas durante la meiosis.

Los microtúbulos son de gran importancia en el proceso de la meiosis ya que son el principal componente del huso meiótico el cual está encargado de alinear y segregar correctamente los cromosomas homólogos en la anafase I, y las cromátidas hermanas en la anafase II.

3.2.3.2. Maduración nuclear

Seguido de un pico preovulatorio de LH la meiosis se reinicia y posteriormente entra en una etapa de diacinesis donde los cromosomas nuevamente se condensan, la cantidad de quiasmas disminuye y los cromosomas homólogos permanecen unidos solo por sus extremos. En la etapa final de la profase I se da la ruptura de la vesícula germinal donde se da

la unión de los microtúbulos y los cinetocoros. En la metafase I la ubicación de los cromosomas homólogos es en el plano ecuatorial donde se encuentran unidos entre sí por los extremos y los centrómeros los ubican en los polos opuestos. Pasando al anafase I se da la separación de los cromosomas homólogos cada uno con dirección a los respectivos polos. Cuando llegan a los polos, en la etapa de la telofase I, se expulsa el corpúsculo polar que no es otra cosa que uno de los grupos de cromosomas homólogos y el otro grupo de cromosomas homólogos sigue con la segunda división meiótica. Cuando los ovocitos llegan al estadio de metafase II se encuentran los cromosomas ubicados en el plano ecuatorial con cada cromátida hermana unida por el centrómero a polos opuestos del huso. En esta etapa se detiene nuevamente la meiosis y se volverá a reiniciar cuando se produzca la fecundación. Cuando el espermatozoide ingresa al citoplasma del ovocito maduro este induce por segunda vez el reinicio de la meiosis. En la anafase II los grupos de cromátidas hermanas se van a los polos opuestos y en la telofase II uno de estos grupos es expulsado formando el segundo corpúsculo polar. Finalizadas esas etapas los cromosomas del ovocito y del espermatozoide se descondensan para la formación de los pronúcleos femenino y masculino. Cuando los pronúcleos se comienzan a acercar pasan por una fase de síntesis de ADN para replicar las cromátidas. Posteriormente establecen un contacto entre sí, se desprenden las envolturas nucleares y los cromosomas maternos y paternos se ubican en el huso conformando una sola metafase mitótica. Esta primera mitosis da la formación de las dos primeras células del embrión (Lattanzi, 2010).

3.2.4. La fecundación

En la interacción del espermatozoide y del ovocito se dan diversos sucesos en los que participan componentes nucleares y citoplásmicos de ambos gametos. La fertilización inicia con la interacción y posterior fusión de los gametos, terminando con la asociación de los cromosomas materno y paterno derivados de los pronúcleos (Galina, 2006).

3.2.4.1. Interacción del espermatozoide y el ovocito

Cuando el toro eyacula en la vagina de la vaca solo un pequeño grupo de espermatozoides capacitados logran alcanzar el ovocito y pasar a través del cúmulus oophorus que está formado por células de la granulosa y ácido hialurónico. Esta fase se logra a través de la motilidad hiperactivada que adquiere el espermatozoide en la capacitación y también por la acción de la proteína PH-20 que se encuentra en la membrana plasmática del espermatozoide que tiene un dominio con actividad hialuronidasa. (Velásquez, 2004).

La interacción de los espermatozoides con el ovocito en los mamíferos se da mediante diversos procesos como son: atravesar las dos envolturas extracelulares alrededor del ovocito y finalmente la membrana plasmática del ovocito. La adhesión de la membrana gametos y la posterior fusión dara la creación de los embriones (Janice, 2009).

Finalizada la ovulación el ovocito en estado de metafase II con presencia del primer cuerpo polar, envuelto en su corona radiada y líquido folicular cae en el infundíbulo del oviducto y baja hacia el ampolla donde se realiza la concepción. El ovocito eclosionado (Figura 1) comienza a perder células del cúmulus mediante procesos autolíticos y presencia de bicarbonato en las secreciones del oviducto. Los espermatozoides capacitados penetran al ovocito previamente desnudado. El espermatozoide también desnuda al ovocito para poder ingresar a través de las células del cúmulus y para eso utiliza la hialuronidasa presente en el acrosoma el cual actúa desdoblado el ácido hialurónico, componente del cemento celular de las células del cúmulus (Schroeder, 1999).

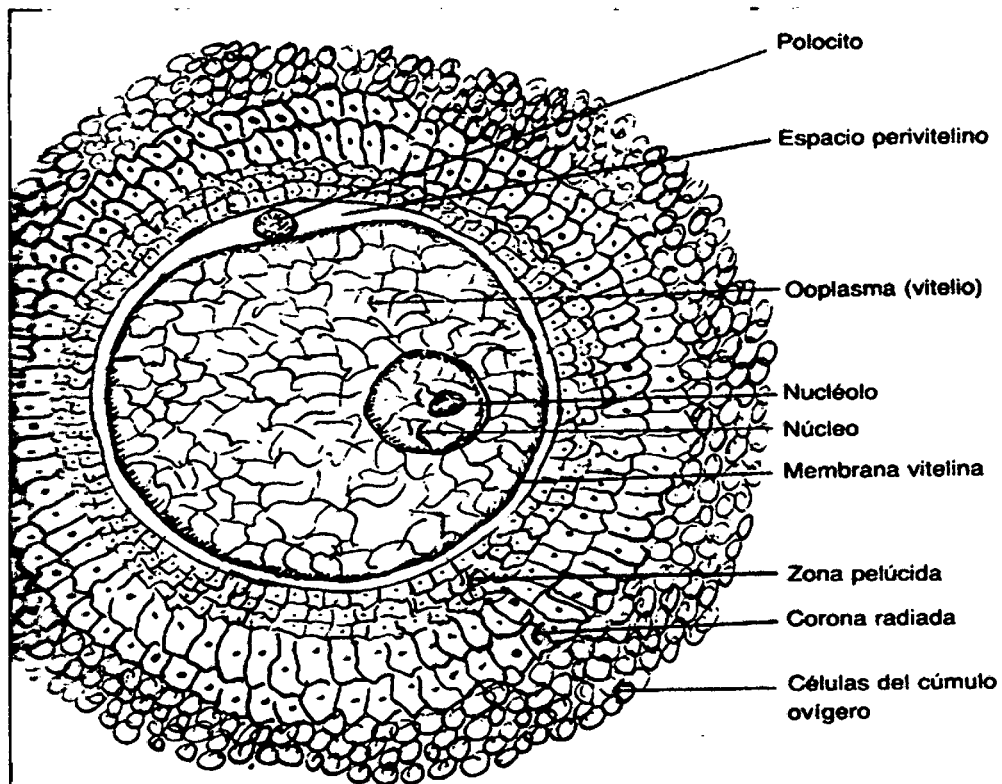


Figura 1: Ovocito eclosionado Fuente: Fisiopatología Reproductiva de la Vaca (1999)

a) Denudación del ovocito

La hialuronidasa que se encuentra en el acrosoma del espermatozoide es la encargada de abrirle paso hacia la zona pelúcida del ovulo. Es de gran importancia el proceso de denudación del ovocito fecundado ya que esto permitirá que se puedan dar los intercambios gaseosos y metabólicos necesarios para que pueda vivir. En los exteriores de la matriz acrosomal existen proteínas que son liberadas y actúan en la unión del espermatozoide a la zona pelúcida (ZP) e incrementan la motilidad del espermatozoide para su paso por la ZP (Buffone *et al.*, 2009).

b) Penetración del espermatozoide

Las barreras que debe pasar el espermatozoide para llegar al citoplasma celular son: las células del cúmulo en desintegración, la corona radiada, las células de

la zona pelúcida, el espacio perivitelino y membrana vitelina. El espermatozoide es guiado al ovocito a través de las células del cúmulo y especialmente las de la corona radiada. En el acrosoma del espermatozoide se produce la acrosina que se encarga de hacer hendidura en la ZP para que penetre por un tiempo de 30 minutos (Schroeder, 1999).

La penetración de la ZP se da en dos mecanismos uno mecánico en el que las fuerzas generadas por el movimiento hiperactivo del espermatozoide lo ayudan a atravesar la ZP y el otro enzimático donde las enzimas son liberadas durante la reacción acrosomal (RA) y hacen una abertura en la ZP para la penetración del espermatozoide (Galina, 2006).

c) Reacción acrosómica (RA)

La reacción acrosómica es la liberación de los componentes del acrosoma, donde el Ca^{2+} extracelular es considerado esencial. (Buffone *et al.*, 2009).

El acrosoma es la estructura que cubre el núcleo en la cabeza del espermatozoide. Su forma y tamaño varía en las especies pero su estructura básica es muy similar en todos los mamíferos. La acrosina es de gran importancia porque facilita la penetración de la ZP. El espermatozoide penetra la ZP del ovocito creando una fisura igual al ancho y alto de su cabeza (Buffone *et al.*, 2009).

Investigaciones recientes han comprobado que el acrosoma no solo está compuesto por enzimas sino también por partículas llamadas matriz acrosomal que están compuestas por proteínas que también son mediadores en la unión de los espermatozoides a la ZP (Figura 2) (Buffone *et al.*, 2009).

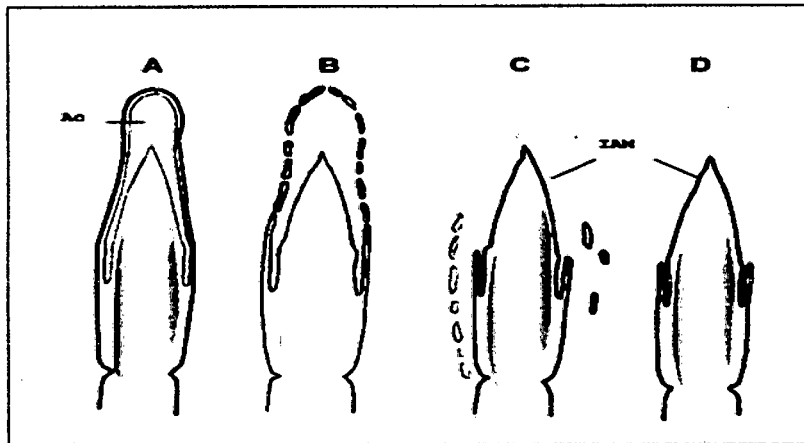


Figura 2: Esquema ilustrativo de las diferentes etapas producidas durante la reacción acrosómica del espermatozoide. A: Espermatozoide no reaccionado, B: Reacción acrosómica en proceso, C-D: Espermatozoide reaccionado, Ac: Acrosoma, IAM: Membrana acrosomal interna. Fuente: Velásquez J G, Estudio del reconocimiento y la unión entre gametos en la especie bovina (*Bos taurus*). Papel del ácido siálico en la interacción espermatozoide-zona pelúcida: Tesis Doctoral. 2004.

Solamente aquellos espermatozoides que tengan reacción acrosomal van a ser capaces de atravesar la ZP, unirse a la membrana plasmática y fusionarse con el ovocito. A parte de la zona pelúcida como inductor fisiológico de la reacción acrosomal, la progesterona presente en el fluido folículo y secretada por las células del cúmulo también tienen un importante función en este proceso (Galina, 2006).

d) Fusión de gametos

La fusión entre las membranas plasmáticas de los gametos femenino y masculino tiene como requisito la RA. Cuando el espermatozoide ha pasado a través de la ZP, su cabeza se desplaza hacia el espacio vitelino y contacta con el oolema. Cuando el espermatozoide penetra el oolema su material celular se dispersa dentro del citoplasma del ovocito. (Alonso y Caccia, 2007).

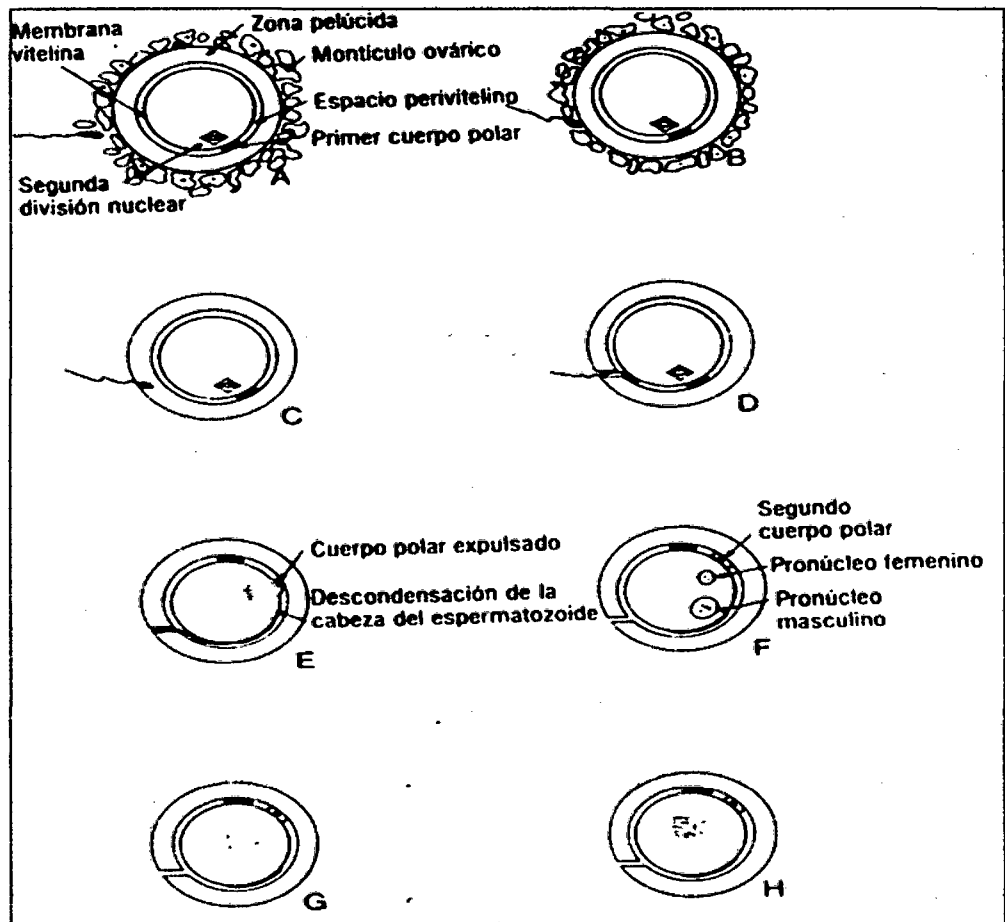


Figura 3: Pasos de la fecundación A. El espermatozoide entra por primera vez al montículo ovárico y penetra en el primer cuerpo polar que está presente en el espacio perivitelino y el huso metafásico del ovocito secundario está en el citoplasma. B. Un espermatozoide ha experimentado reacción acrosómica. C. La membrana acrosómica externa del espermatozoide entra en contacto con la ZP. D. Las enzimas expuestas en la superficie de la membrana permiten la penetración hacia el espacio perivitelino. E. La región ecuatorial de la cabeza espermática se fija a la membrana vitelina y se fusiona con ella, estimulando la terminación de la segunda división meiótica. F. El pronúcleo femenino y el masculino, se forma después de la liberación del segundo cuerpo polar. G. Los pronúcleos emigran al centro de los ovocitos, donde las envolturas nucleares se dispersan. H. Se inicia la profase de la primera división mitótica. Fuente: Alonso y Caccia. Fisiología de la Reproducción de la Vaca. 2007.

La fecundación es un proceso que depende principalmente de la fusión espermatozoide ovocito, la cual se da cuando el espermatozoide con el acrosoma reaccionado ha atravesado la ZP, llegando al espacio perivitalino y contactando con la membrana del ovocito. Una vez realizada la fusión el espermatozoide deja de moverse y es introducido en su totalidad dentro del ovocito. A través de la fusión de membranas la porción posterior de la cabeza espermática y el flagelo se internalizan en el ovocito, mientras que la porción anterior de la cabeza se engloba por fagocitosis (Figura 4). (Velásquez, 2004).

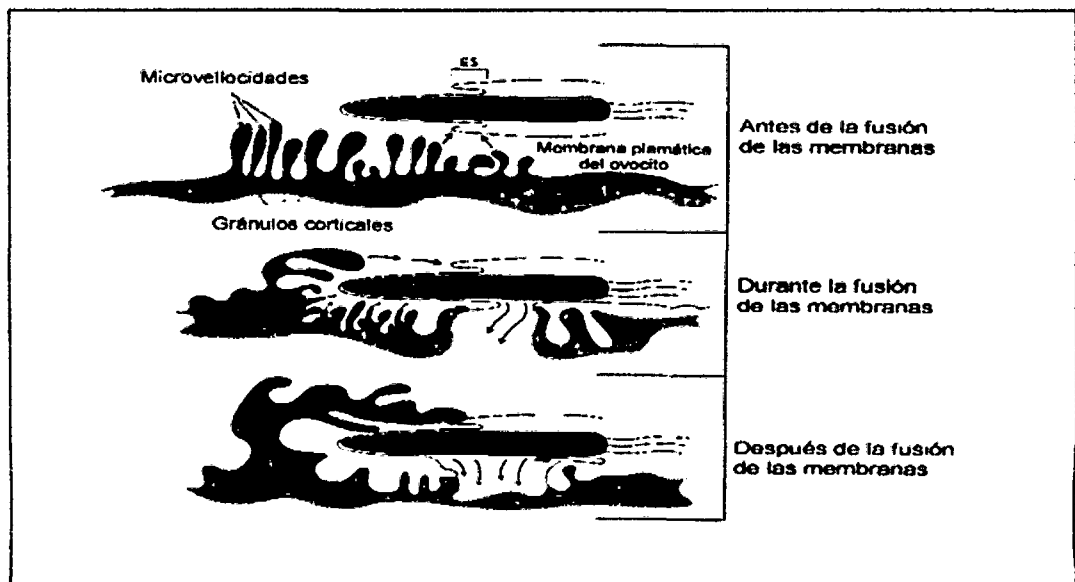


Figura 4: Diagrama de la fusión de las membranas del espermatozoide y oolema. Fuente: Velásquez J G, Estudio del reconocimiento y la unión entre gametos en la especie bovina (*Bos taurus*). Papel del ácido siálico en la interacción espermatozoide-zona pelúcida: Tesis Doctoral. 2004.

Uno de los primeros sucesos que ocurre en el núcleo espermático al momento de incorporarse en el citoplasma del ovocito, es el rompimiento de la envoltura nuclear. A efecto de esto la cromatina es expuesta al citoplasma del ovocito y comienza a descondensarse hasta tornar una masa homogénea dispersa. En este proceso las protaminas son removidas del ácido desoxirribonucleico (DNA) y se reemplaza por histonas.

Luego de estos cambios se da el ensamblaje de una nueva envoltura nuclear alrededor de la cromatina descondensada para llevar a la formación del pronúcleo masculino y poder iniciar la replicación de DNA. Terminada la anafase II, los cromosomas del ovocito que se encuentran dispersos en el cigoto comienzan a organizándose y a su alrededor comienza a formarse una nueva envoltura nuclear dando formación al pronúcleo femenino y la replicación del DNA (Galina, 2006).

De manera casi sincronizada se realiza la síntesis de DNA en ambos pronúcleos. El ovocito posee una actividad supresora que asegura el desarrollo sincrónico de los pronúcleos a través de la prevención del desarrollo del pronúcleo femenino durante las primeras horas de la activación del ovocito. Cuando ya se encuentran formados los pronúcleos estos comienzan a crecer y acercarse hasta fusionarse; posteriormente la envoltura nuclear se rompe dejando escapar una masa de cromosomas parcialmente condensados. Los cromosomas completan su condensación y se acoplan, uniéndose los caracteres hereditarios paterno y materno. (Galina, 2006).

3.2.5. Segmentación embrionaria

Mediante la unión del espermatozoide con el ovocito se inician reacciones químicas y físicas, las cuales conducen a una sola célula a divisiones celulares continuas que conllevan a la formación de un individuo, el cual se conecta metabólicamente con la madre la que se encarga de compartir sus nutrientes y permitirle nacer cuando ha alcanzado su grado de desarrollo y madurez adecuado para su supervivencia (Alonso & Caccia, 2007).

El cigoto con su nuevo material genético y modificación del citoplasma, inicia la producción de un organismo multicelular. Este se inicia a través de un proceso llamado segmentación, que es una serie de divisiones donde el volumen del citoplasma del ovocito es dividido (Galina, 2006).

La pre-implantación es un proceso caracterizado por una serie de divisiones, activación del genoma embrionario el cual se compacta, se cavita (formación del blastocisto) para finalmente incubarse y ubicarse en la zona de implantación en la pared uterina. Cuando se ha logrado la pre-implantación se

da la formación de una estructura llena de fluido llamado blastocisto, compuesto de un epitelio exterior trofoectodermo (TE), que rodea un pequeño grupo de células llamado masa celular interna (MCI) y una gran cavidad llena de líquido. El TE, es el primer tipo de células diferenciadas del desarrollo, es un tejido especializado que forma la placenta. La MCI son células que conforman el embrión (Duranthon y Col, 2008).

3.2.5.1. Formación del blastocisto

Cuando el embrión llega a una división de 16 células, las blastómeras comienzan a formar uniones estrechas entre ellas adoptando una forma circular ligeramente lobulada denominada mórula (Figura 5). Finalizada la formación de la mórula, las blastómeras empiezan a separarse en dos grupos las células internas y las externas. Las células internas desarrollan uniones tipo gap, que permiten la comunicación intercelular y van a mantener agrupado a este conjunto celular. Las células externas desarrollan uniones estrechas u ocluyentes, que se producen para modificar las características de permeabilidad. Cuando las uniones estrechas se encuentran formadas los fluidos empiezan a acumularse en el interior del embrión. Esto se da cuando se introducen iones al interior de la mórula y 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. El embrión aún rodeado por la ZP, recibe el nombre de blastocisto y en él se diferencian dos poblaciones de células, la interna que dará origen al embrión y la que está situada periféricamente que dará origen a la placenta y que interviene en la ingestión selectiva de nutrientes (Hafez, 2000). Las células del trofoblasto que son las que se encuentran periféricamente poseen permeabilidad selectiva favoreciendo el transporte de agua y sodio para la formación del blastocele.

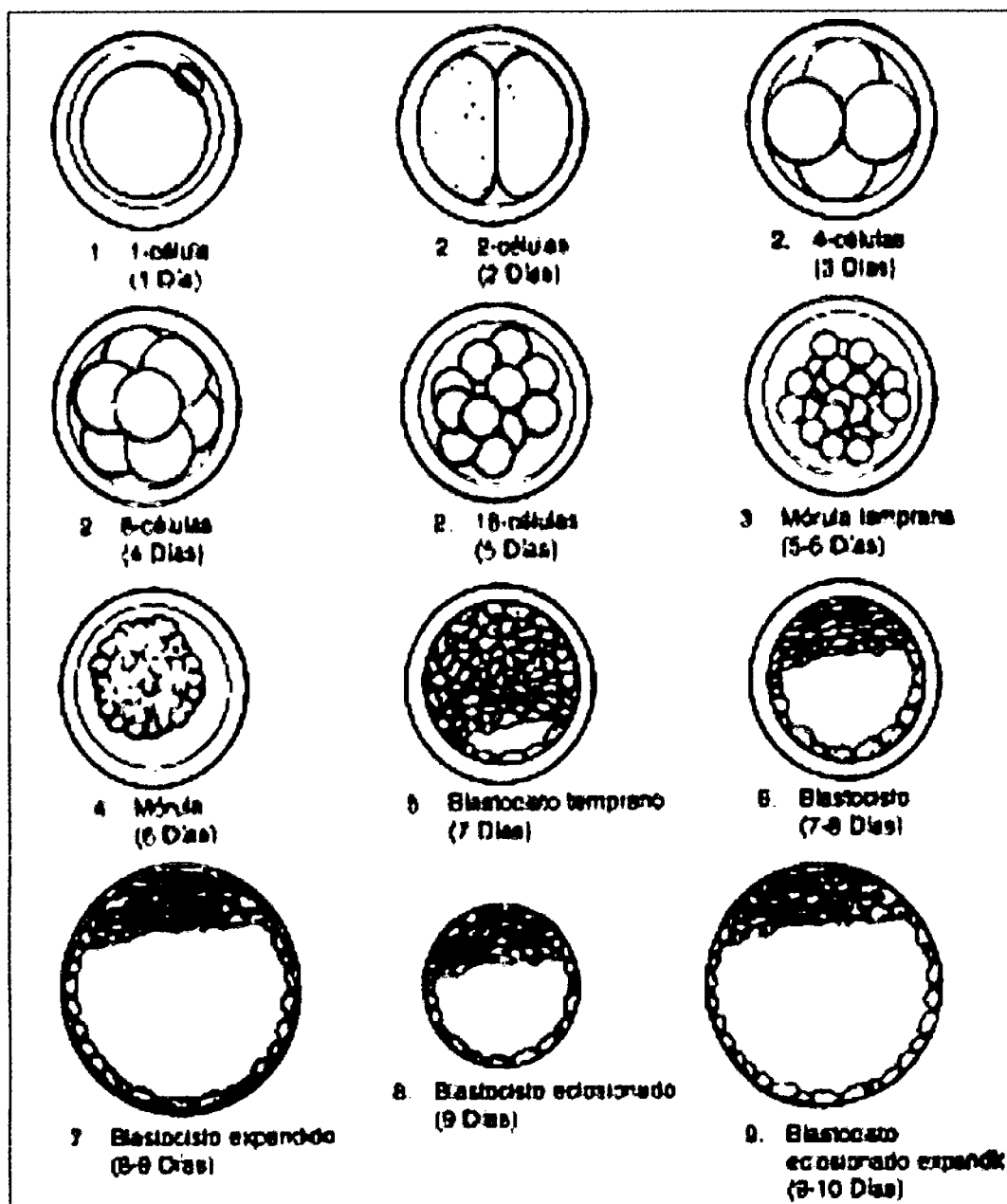


Figura 5: Estado de desarrollo Valoración morfológica según IETS

Fuente: Valoración morfológica según IETS (2010).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Ubicación

El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza.

4.2. Material biológico

4.2.1. *Aspiración, medición y selección de los complejos ovocito-cúmulus (COCs)*

Todos los medios y reactivos usados fueron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) a menos que se señale lo contrario. Se colectaron y transportaron ovarios del centro de beneficio de Chachapoyas-Amazonas, en un recipiente isotérmico conteniendo cloruro de sodio al 0.9% (wt/vol) con 0.025 mg/ml de estreptomina, temperado a 37 °C. En el laboratorio, los ovarios fueron nuevamente lavados en cloruro de sodio al 0.9%. Luego, se aspiraron los complejos ovocito-cúmulus (COCs) usando una jeringa de 10ml y una aguja de 18 G con medio de manipulación HEPES suplementado con 50 mg/ml de gentamicina y 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB). Los COCs fueron aspirados separadamente a partir de tres diámetros foliculares de la superficie del ovario; 1-2, 3-4 y 5-6mm, fueron medidos con una regla. Luego de tres lavados, se midió por cada grupo el diámetro del ovocito; desnudado previamente con 0.5mg/ml de hialuronidasa (el diámetro excluyó la zona pelúcida), con ayuda de un software con cámara (Olympus, Japón) adherida a un microscopio invertido (Olympus, Japón).

La clasificación de los COCs por grupo se realizó en cuatro categorías, dependiendo de la presencia y calidad de las células del cúmulus, la coloración y forma del ovocito (Figura 6) (Liebfried y First., 1979; Sato *et al.*, 1990).

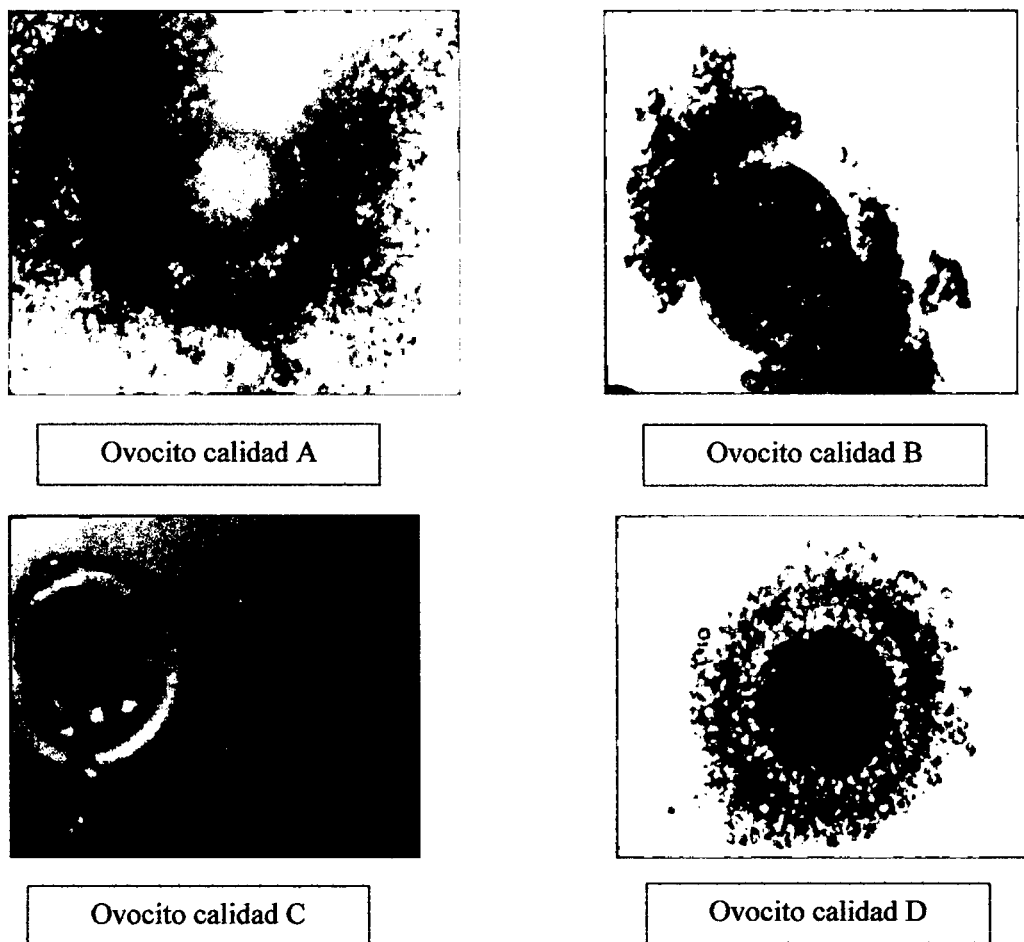


Figura 6: Categorización de los ovocitos

Las fotografías muestran ovocitos en diferentes categorías: ovocito con células del cúmulus compacta mayor a 4 capas y con citoplasma homogéneo (A), ovocito con 1 a 3 capas de células del cúmulus y un citoplasma homogéneo (B), ovocito con un cúmulus denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras (C) y ovocito con células del cúmulus expandidas y un citoplasma irregular y con zonas oscuras (D). Fuente: Liebfried y First. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. 1979.

4.2.2. *Maduración in vitro de los complejos ovocito-cúmulus*

Los COCs de otro lote de ovarios fueron usados para este experimento, siguiendo el procedimiento de aspiración y lavado descrito previamente. Los grupos de COCs según procedencia de diametro folicular fueron clasificados

de forma similar a lo descrito previamente, para posteriormente ser cultivados *in vitro* separadamente por 24 horas en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ a 38.5 °C, en placas de 4 celdas (NUNC, USA) en medio de maduración TCM-199 suplementado con 0.25 mg/ml de piruvato de sodio, 50 ug/ml de gentamicina, 0.01UI/ml de hormona folículo estimulante (FSH), 0.01UI/ml de hormona luteinizante (LH), 0.1mg/ml de glutamina, 10ng/ml factor de crecimiento epidermal (EGF), 1ug/ml de 17β-estradiol y 10% SFB. La estructura nuclear se evaluó con un microscopio binocular (Olympus, Japón) previa fijación de los ovocitos en láminas portaobjeto con ácido acético-etanol (1:3, vol/vol) y teñidos con 1% de aceto-orceina (wt/vol), según lo reportado por Hirao *et al.*, 1995; Motlik y Fulka, 1976).

Los ovocitos fueron clasificados como vesícula germinal (VG) cuando presentaban la membrana nuclear intacta y la cromatina en el nucleoplasma. Los ovocitos fueron clasificados como maduros (metafase II-MII) por la presencia del corpúsculo polar, los cromosomas condensados y la ausencia de la membrana nuclear. Otro grupo de ovocitos fueron seleccionados para continuar el experimento de fecundación *in vitro* post maduración (Figura 7).

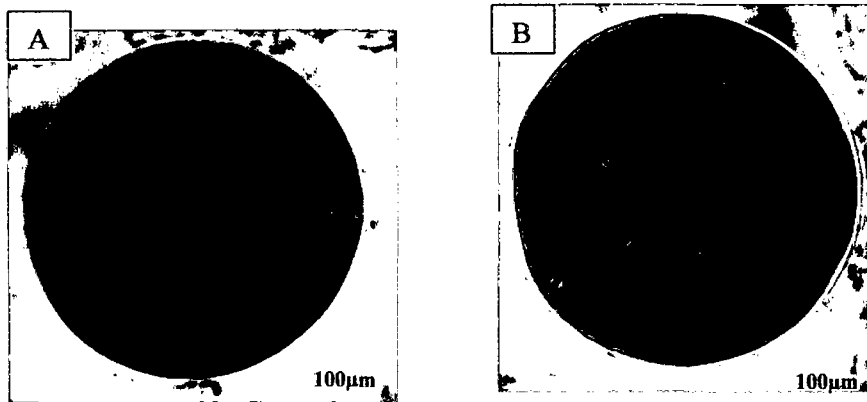


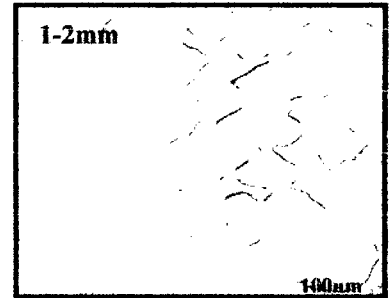
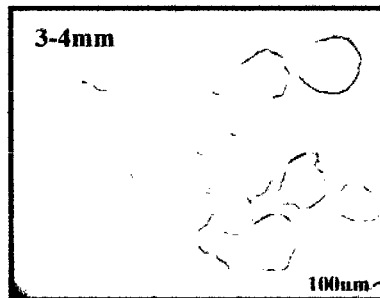
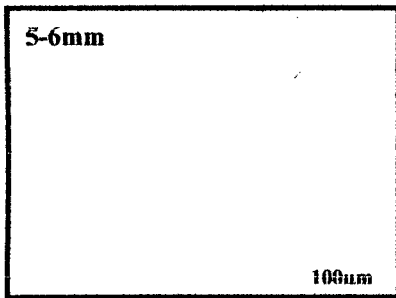
Figura 7: Maduración nuclear. Las fotografías muestran ovocitos en diferentes estadios de la maduración nuclear: Vesícula Germinal (A) y Metafase II (C).

Fuente: propia

4.2.3. Fecundación *in vitro* de los complejos ovocito-cúmulus

Para este experimento se usó semen nacional congelado de la raza Holstein. Espermias móviles fueron lavados, seleccionados y capacitados por el método de Percoll (Parrish *et al.*, 1995) y adicionados al medio de fecundación TALP-FIV (Vajta, 2000), suplementado con 0.25 mg/ml de piruvato de sodio, 50 ug de gentamicina, 0.03mg/ml de heparina y 3 mg/ml de suero de albumina bovina factor cinco (BSA-V). Los COCs madurados (Figura 8) y los espermatozoides capacitados se incubaron por 18 horas en una atmosfera humidificada a 38.5°C con 5% CO₂.

A



B

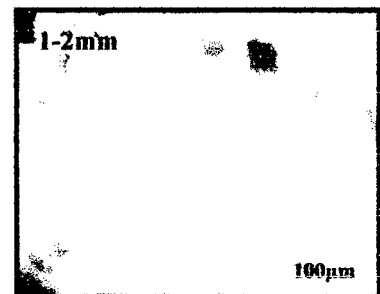
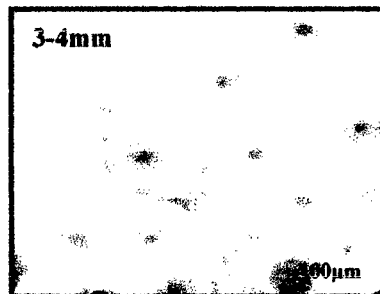
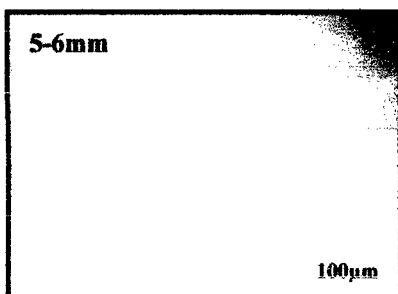


Figura 8: Ovocitos inmaduros y ovocitos maduros con expansión de células del cúmulus. Las fotografías muestran ovocitos inmaduros (A) y ovocitos madurados *in vitro* después de un periodo de 24h (B) obtenidos de folículos de tres diámetros diferentes. Fuente: propia.

4.2.4. Cultivo *in vitro* de los cigotos

Se cultivaron los cigotos en grupos de 25 en una placa de cuatro pocillos durante 7 días a 38.5°C, con mezcla de gases, utilizando el medio SOF base (Vajta *et al.*, 2000) suplementado con 0.044g/l de piruvato de sodio, 0.039g/l de L-glutamina, 3.0mg/ml de Suero Albumina Bovina (BSA-FAF), 1X de amino ácidos esenciales, 1X de amino ácidos no esenciales, 10mg/ml de EGF, 0.1mg/mL de ácido cítrico, 0.5mg/ml de myo-inositol, 50µg/ml de gentamicina y 2% de SFB. (Figura 9). Se consideraron ovocitos degenerados a aquellos que no presentaron división celular y tenían poco o nada de contenido citoplasmático.

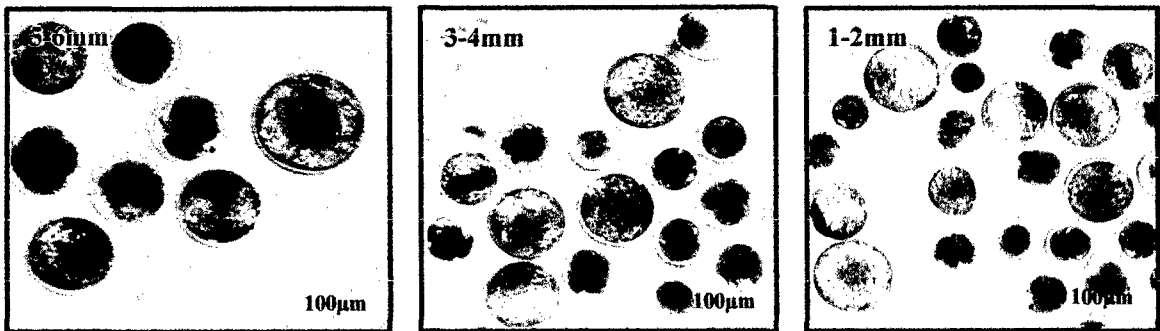


Figura 9: Blastocitos obtenidos a los 7 días post fecundación. Las fotografías muestran embriones a partir de ovocitos obtenidos de folículos de tres diámetros diferentes en categoría de blastocistos al día 7 de cultivo. Fuente: propia.

4.3. Análisis estadísticos de los resultados:

Para determinar la existencia o no de diferencias estadísticas entre los diámetros de los ovocitos por cada diámetro folicular se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) al 5% de significancia. Para identificar el diámetro folicular que contenga ovocitos con mayor competencia meiótica y desarrollo embrionario *in vitro* se usó el post test de TUKEY. En ambos casos el programa estadístico empleado fue el SPSS ver. 19.

V. RESULTADOS

En la Tabla 1, se observa que no existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los diámetros de los ovocitos obtenidos de folículos de diferentes diámetros. Además, el número de ovocitos de categoría A (Liebfried y First., 1979; Sato *et al.*, 1990) fue mayor para folículos de diámetro entre 1-2mm y 3-4mm que para los folículos de diámetro 5-6mm.

Tabla 1. Relación entre el diámetro folicular, categoría de los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) y diámetro del ovocito

Diámetro Folicular (mm)	Nº Ovocitos examinados	Diámetro de ovocitos (μm)
1 a 2 mm	30	115, 1 \pm 6,9 ^a
3 a 4 mm	30	113, 0 \pm 6,8 ^a
5 a 6 mm	30	113, 8 \pm 5,7 ^a

a, b; letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

De los ovocitos medidos tenemos que el promedio de diámetro de ovocitos obtenidos de folículos de 5-6mm es de 113.84, los ovocitos obtenidos de folículos de 3-4mm están en un promedio de 113.04 μm , los ovocitos obtenidos de folículos de 1-2mm están en un promedio de diámetro de 115.15 μm sin presentar diferencia significativa entre ellos.

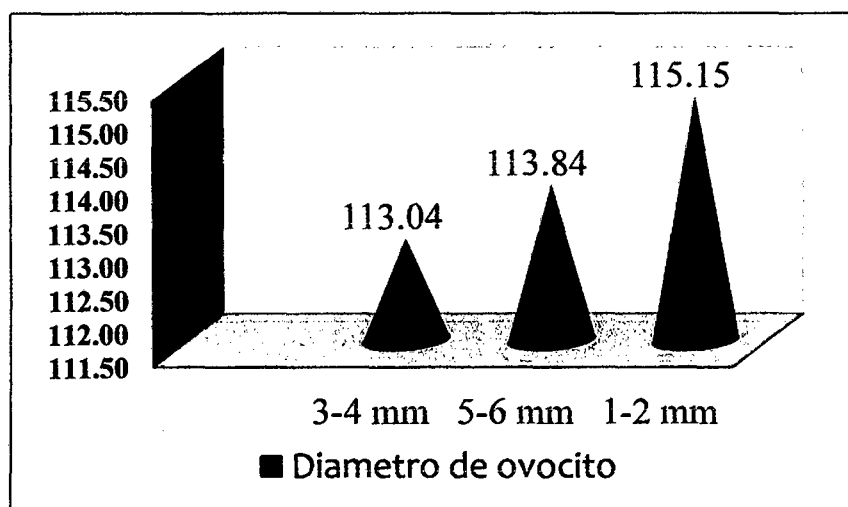


Gráfico 1. Comparación entre diámetro folicular y diámetro de ovocito.

La competencia meiótica de los ovocitos por diámetro folicular fue evaluada en otro grupo de ovocitos colectados. La Figura 3 y Tabla 2 muestran que los ovocitos de diámetros foliculares de 1-2mm y 3-4mm presentaron significativamente mayor competencia meiótica que aquellos procedentes de los folículos de 5-6mm, logrando un porcentaje de maduración de 89, 85 y 25%, respectivamente.

Tabla 2. Competencia meiótica post 24h de maduración de los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) según diámetro folicular.

Diámetro Folicular (mm)	Nº Ovocitos examinados	Diámetro de ovocitos (μm)
1 a 2 mm	434	385 (89.0)a
3 a 4 mm	86	73 (85.0)a
5 a 6 mm	12	3 (25.0)b

a, b; letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

En la tabla 3, se observa que los ovocitos extraídos de folículos de 3-4mm y 5-6mm obtuvieron mayor porcentaje de segmentación con 86% y 89% respectivamente, y los ovocitos extraídos de folículos de 1-2mm obtuvieron un porcentaje de segmentación más bajo con 69% presentando diferencia significativa entre ellos.

Tabla 3. Segmentación embrionaria post 18h de fecundación de los complejos ovocitos-cúmulus (COCs) según diámetro folicular.

Diámetro Folicular (mm)	N° Ovocitos examinados	Segmentación embrionaria n°							n° (%) segmentación total
		Ho	2cel	4cel	8cel	16cel	Mor.	Blas.	
1 a 2 mm	129	40	10	3	8	20	16	32	89(69)a
3 a 4 mm	124	18	12	7	15	13	21	38	106(86)b
5 a 6 mm	18	2	1	0	1	2	4	7	16(89)b

a, b; letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

En la tabla 4 se puede observar que existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el porcentaje de desarrollo embrionario de los ovocitos extraídos de los tres rangos foliculares. Se presentó en mayor porcentaje el desarrollo de blastocitos en los folículos de 3-4mm (31%) y 5-6mm (39%) en comparación de los folículos de 1-2mm (25%).

Tabla 4. Desarrollo embrionario de los complejos ovocitos-cumulo (COCs)

Diámetro Folicular (mm)	N° Ovocitos examinados	Desarrollo embrionario (Blastocistos), n (%)
1 a 2 mm	129	32 (25.0)a
3 a 4 mm	124	38 (31.0)b
5 a 6 mm	18	7 (39.0)c

a, b, c; letras diferentes indica que hay diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Los COCs fueron madurados por 24 h, fecundados por 18 h y cultivados *in vitro* por siete días en medio de cultivo SOF para luego ser analizados según su clasificación. Valores con diferentes superíndices en cada fila representan diferencias significativas ($P < 0.05$).

VI. DISCUSIÓN

Según Blondin y Sirard, 1995, establecieron que a mayor diámetro folicular la competencia meiótica es mejor. En nuestro estudio se encontró que el diámetro folicular de 1-2mm contenía ovocitos con un promedio de 115,1 μ m de diámetro de ovocitos mayor pero no significativo al promedio similar del diámetro de los ovocitos extraídos de folículos de 3-4mm (113, 0 μ m) y 5-6mm (113, 8 μ m). Lo que demuestra que los ovocitos de folículos pequeños (1-2mm) ya han completado su fase de crecimiento. En suma a ello, se observó que los ovocitos extraídos de folículos de 1-2mm obtuvieron un porcentaje de maduración de 89% similar al porcentaje de maduración de 85% de los ovocitos extraídos de los folículos de 3-4mm, sin embargo el porcentaje de maduración de los ovocitos extraídos de folículos de 5-6mm fue de 25% significativamente menor a los promedios antes mencionados, este resultado podría deberse a que los folículos de mayor diámetro en nuestro experimento, pueden contener ovocitos en estado de degeneración, ya que las condiciones nutricionales, ambientales y de manejo son pobres en la región de Amazonas y además, se ha demostrado que estos factores tienen influencia sobre el estado reproductivo de la hembra bovina.

McCaffrey et al 1992, observo que folículos de 6-8mm tienen potencial de segmentación y desarrollo mayor que de folículos <6mm, lo cual fue similar a los resultados obtenido en este estudio ya que los ovocitos que llegaron a tener mayor porcentaje de segmentación fueron los ovocitos extraídos de 3-4mm y 5-6mm con 86% y 89% respectivamente a comparación de los ovocitos extraídos de los folículos de 1-2mm quienes obtuvieron un porcentaje de segmentación de 69%, lo que significa que estos ovocitos pueden ser fecundados pero no precisamente van a llegar a la última etapa de desarrollo.

Tan y Lu (1990), demostraron que los ovocitos obtenidos de folículos >6 mm de diámetro tenían mayor porcentaje de desarrollo en blastocistos. En nuestro estudio se encontró que el desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos extraídos de folículos de 5-6mm fue mayor significativamente al porcentaje de desarrollo embrionario de los ovocitos extraídos de folículos de 3-4mm y estos a su vez mayores al porcentaje de desarrollo embrionario de los ovocitos extraídos de folículos de 1-2mm, similar a lo reportado por Sirard et al., 1992; Tan y Lu (1990) y McCaffrey et al., 1992, demostrando así que los ovocitos de menor diámetro folicular completaron su crecimiento y adquirieron competencia meiótica pero no competencia de desarrollo.

VII. CONCLUSIONES

- El diámetro folicular no está directamente relacionado con el diámetro del ovocito.
- Los ovocitos obtenidos de folículos de 1-2mm y 3-4mm presentaron competencia meiótica superior, obteniendo mayor porcentaje de ovocitos en MII en estos grupos.
- La capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* fue superior en ovocitos procedentes de folículos de 3-4mm y 5-6mm, obteniendo mayor porcentaje de desarrollo embrionario en estos grupos.

VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la edad, estado fisiológico, presencia de folículo de graf,cuerpo luteo, cuerpo hemorrágico y cuerpo albicans antes de realizar la aspiración folicular de los ovarios de las vacas.
- Se recomienda aspirar los folículos a partir de los diámetros de 1-2mm ya que se ha demostrado que tienen la capacidad de generar embriones.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Alonso A, Caccia M. (2007). Fisiología de la Reproducción de la Vaca: IRAC. p. 101.
- Blondin P, Sirard MA. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 41:54–62.
- Buffone MG, Rodriguez E, Storey BT, Gerton G. (2009) Acrosomal Exocytosis of Mouse Sperm Progresses in a Consistent Direction in Response to Zona Pellucida. *Journal of Cellular Physiology.* 611-620.
- Byskov AG, Hoyer PE (1994). Embriology of Mammalian Gonads and Ducts. In: Knobil E, Neill J, et al., editors. *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press. p. 487-541.
- Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20:715-723.
- Crozet N, Motlik J, Szollosi D. (1981). Nucleolar fine structure and RNA synthesis in porcine oocytes during the early stages of antrum formation. *Biol Cell.* 41:35-42.
- Duranthon V, Watson A, Lonergan P. (2008). Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment: *Reproduction.* p. 135, 141 – 150.
- Erickson BH (1966b). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci.* 25:800-805.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836-848.
- Galina C, Valencia J. (2006). Reproducción de animales domésticos: México, Segunda Edición, Limusa. p. 128, 130, 135, 136.
- García J, Martínez JL. (2013). Implementación de un protocolo de Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano.

- Gilchrist, R., J. Thompson. (2007). Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theryogenology* 67: 6-15.
- Hafez E.S.E, Hafez B. (2002). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales: Ed. McGraw- Hill Interamericana, Séptima edición. p. 5-137.
- Henao R, Guillermo, Trujillo ALE. (2000). Establecimiento Y Desarrollo De La Dominancia Follicular Bovina: Rev. Col. de Cien. Pec. Vol. 13 No.2. p. 118-120
- Hernández HF. Fecundación in vitro. (2005). Disponible en: URL:http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manualganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf
- Herradón PG, Quintela LA, Becerra JJ, Ruibal S. Fernández M. (2007). Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora Genética en Bovinos. Disponible en: URL:http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2015%20Supl/p_herradon.pdf
- Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM. (1995). Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote* . 3(4):325- 332.
- International Embryo Transfer Society, Manual, IETS. (2010). Pg. 67-70.
- Janice PE, (2009). Egg Integrins: Back in the Game of Mammalian Fertilization: *ACS Chemical Biology* vol.4 n°.5 , 321–323 .
- J.K. Findlay, J.B. Kerr, K. Britt, S.H. Liew, E.R. Simpson, D. Rosairo, A. Drummond. (2009). Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. *Anim. Reprod.* v.6, n.1, p.16-19.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428:145-150.
- Lattanzi ML. Regulación de la maduración de ovocitos por factores paracrinos. (2010).
- Liebfried, L., First, N.L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci.* 48:76-86.

- Liu, Z y Foote, R.H. (1995). Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biology of Reproduction* 53:786-790.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Mol Reprod Dev.* 37:48-53.
- Lorenzo, P.L. (1994). Fecundación y desarrollo embrionario temprano. En: *Reproducción de los animales domésticos*. Cap. 6. Madrid: Ed. Aedos. p 182-187.
- Memili, E., H. Sagirkaya, M. Misirlioglu, A. Kaya, N.L. First y J.J. Parrish. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultures in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 101: 225-240.
- McCaffrey C, Lu KH, Sreenan JM. (1992). Factors involved in the in vitro development of IVF cattle ova. *Proceedings of the Irish Grassland and Animal Production Association, 18th Annual Research Meeting*. Dublin: O'Kiely, pp 33-34.
- Motlik J, Fulka J. (1976). Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and in vitro. *J Exp Zool.* 198(2):155- 162.
- Palma GA. (2001). *Biología de la Reproducción: Gustavo Palma*. p. 62, 37.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. (1995). Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology*.44:859-870.
- Peláez v a. (2011) producción in vitro de embriones bovinos.
- Quintana, M.D., P.E.C. Campos, P. Herrera, C. Gallego, E. Padrón. (2012). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización in vitro FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. *Revista de Salud Animal* 34(1):53-56.
- Russe I (1983). Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* 24:77-92.

- Ryan KE, Glister C, Lonergan P, Martin F, Knight PG, Evans AC. (2008). Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles: in vitro and in vivo studies in cattle and sheep. *Journal of Ovarian Research* 1 doi:10.1186/1757-2215-1-2.
- Sato, E., Matsuo, M., Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: Improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3', 5' monophosphate. *J Anim Sci.* 68: 1182-1187.
- Schroeder w, Hans. (1999). *Fisiopatología Reproductiva de la Vaca: Librería Medica CELSUS.* P. 235-238.
- Sirard MA, Coenan K, Bilodeau S. (1992). Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology.* 37:39-57.
- Tan SJ, Lu KH. (1990). Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. *Theriogenology.* 33:335 abstr.
- Tilly JL, Telfer EE. (2009). Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? *Mol Hum Reprod* 15:393-398.
- Urrego A, Restrepo G. (2006). Implicaciones de la biotecnología reproductiva en la producción animal. pp. 64-78.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. (2000). New method for culture of zona-included or zona free embryos: the well-of-the-well (WOW) system. *Mol Reprod Dev.* 55:256-264.
- Viana J, Camargo. (2007). Bovine embryo production in Brazil: A new scenario. *Acta Sci Vet.* 35 (3): 915-924.
- Velásquez P, Guillermo J. (2004). Estudio del reconocimiento y la unión entre gametos en la especie bovina (*Bos taurus*). Papel del ácido siálico en la interacción espermatozoide-zona pelúcida: Tesis Doctoral, p. 53-60.
- Vivanco HW. (2007). Situación y proyección de la ganadería peruana.
- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PE, Presicce GA. (1998). Control of oocyte maturation in cows- biological factors. *Theriogenology.* 49:471-82.

X. ANEXOS

Anexos "A"

Protocolos de fertilización *in vitro*

Tabla 1: Preparación de la solución salina.

SOLUCIÓN SALINA 0.9% PARA 1L	
NaCl	9g
Agua destilada	1L
Gentamicina	1ml

* Luego de la preparación llevar a la autoclave para después agregarle el antibiótico.

Tabla 2: Preparación del medio de manipulación.

MEDIO DE MANIPULACIÓN PARA 100ml	
TCM-HEPES	90ml
SFB	10ml
GENTAMICINA	100ul

TABLA 3: Preparación del medio de maduración.

MEDIO DE MADURACIÓN PARA 10ml	
TCM-199	9ml
SFB	1ml
PIRUVATO	20ul
FSH-LH	50ul
GLUTAMINA	60ul
EGF	10ul
ESTRADIOL	10ul
GENTAMICINA	10ul

Tabla 4: Preparación del medio de fertilización

TALP - (FIV)FERTILIZACION			
	MW	mM	500ml
NaCl	58.44	114.0	3.331
KCl	74.55	3.2	0.119
CaCl ₂ + 2H ₂ O	147.00	2.0	0.147
MgCl ₂ + 6H ₂ O	203.30	0.5	0.051
NaHCO ₃	84.01	25.0	1.05
NaH ₂ PO ₄	119.98	0.3	0.018
LACTATO DE Na	112.10	10.0	0.93ml
ROJO FENOL	354.40	1.0mg/100m l	0.005

MEDIO DE FERTILIZACION PARA 10ml	
TALP-FIV	10ml
PIRUVATO	100ul
HEPARINA	100ul
GENTAMICINA	10ul
BSA-FAF	30mg

Tabla 5: Preparación del percoll al 90%

TALP – 10X (Medio utilizado para preparar gradiente de percoll)			
COMPONENTE S	VOLUMEN/25 ml (mg)	VOLUMEN/50ml (mg)	UI Stock de sales
NaCl	6250ul	2.886gr	4M
KCl	57.75 mg	0.1155gr	1M
NaH ₂ PO ₄	9 mg	0.018gr	0.1M
CaCl ₂ (2H ₂ O)	73.5 mg	0.147gr	1M

MgCl ₂ (6H ₂ O)	20.25 mg	0.0405gr	0.1M
HEPES	595 mg	1.19gr	----

PERCOLL AL 90% PARA 40ml	
SP-TL 10X	4ml
NaHCO ₃	84mg
LACTATO DE Na	90ul
PERCOLL	36ml
MgCl ₂ 6H ₂ O	158ul
CaCl ₂ H ₂ O	78ul

Tabla 6: Preparación del medio de capacitación.

TALP – SPERM – BASIC – MEDIA (Gabor)			
INGREDIENTES	1000ml	250ml	500ml
NaClg	5.772	1.443	2.886
KClg	0.231	0.05775	0.1155
NaH ₂ PO ₄ g	0.042	0.0105	0.021
CaCl ₂ + 2H ₂ Og	0.294	0.0735	0.147
MgCl ₂ + 6H ₂ Og	0.223	0.05575	0.1115
LACTATO DE Na	3.7	0.925	1.85
HEPES	2.603	0.65075	1.3015
NaHCO ₃ g	2.1	0.525	1.05
H ₂ Oml	998	249.5	499

MEDIO DE CAPACITACIÓN PARA 50ml	
TALP-SPERM	50ml
PIRUVATO	500ul
GENTAMICINA	50ul
BSA fracción V	300mg

Tabla 7: Preparación del medio SOF.

COMPONENTES	MW () DE W	200ml	250ml
NaCl	58.44	1258.2mg(100mM)	1572.75mg
KCl	74.55	106.8mg(7mM)	133.5mg
KH ₂ PO ₄	136.1	32.4mg(1.2mM)	40.5mg
CaCl ₂ + 2H ₂ O	147	49.6mg	62mg
MgCl ₂ + 6H ₂ O	203.31	19.2mg	24mg
NaHCO ₃	84.01	421.2mg	526.5mg
ROJO FENOL	.-	0.28mg	0.35mg
LACTATO DE Na	//1.3g/ml	94.12ul (60%)	117.65ul

*Filtrar y almacenar a 4°C hasta añadir aditivos (3 tubos de 50ml)

ADITIVOS SOF (medio de cultivo)			
	250ml	100ml	10ml
PIRUVATO	1ml	400ul	40ul
GLUTAMINA	500ul	200ul	20ul
AAE	5ml	2ml	200ul
AANE	2.5ml	1ml	100ul
EGF	250ul	100ul	10ul
AC. CITRICO	250ul	100ul	10ul
MYOINOSITOL	2.5ml	1ml	100ul
SFB	5ml	2ml	200ul
GENTAMICINA	250ul	100ul	10ul
BSA FAF	750mg	0.3g	0.03

Anexos "B"

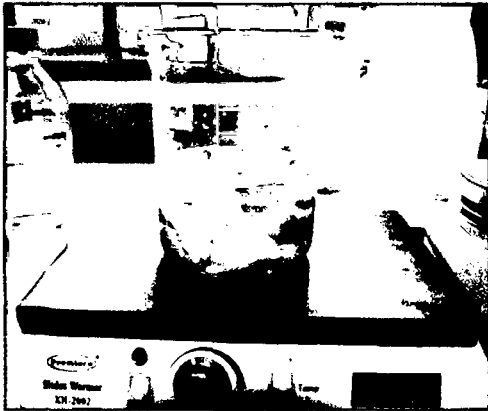
Fotos de los procesos de fertilización *in vitro*



Colecta de muestras (ovarios).



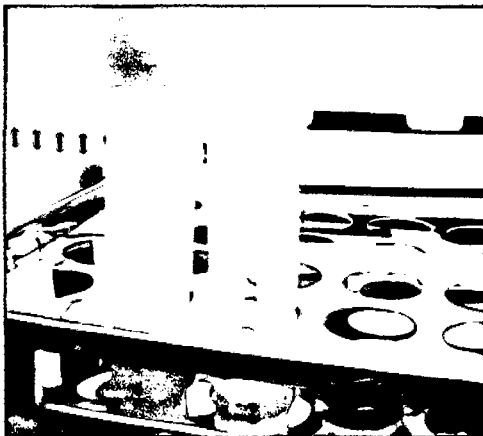
Thermo para el transporte de ovarios.



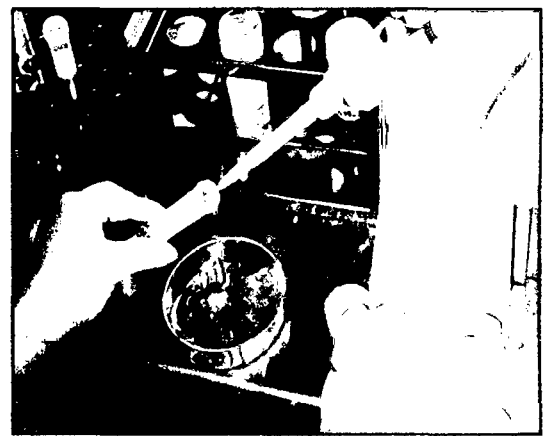
Lavado de ovarios en solución salina al 0.9%.



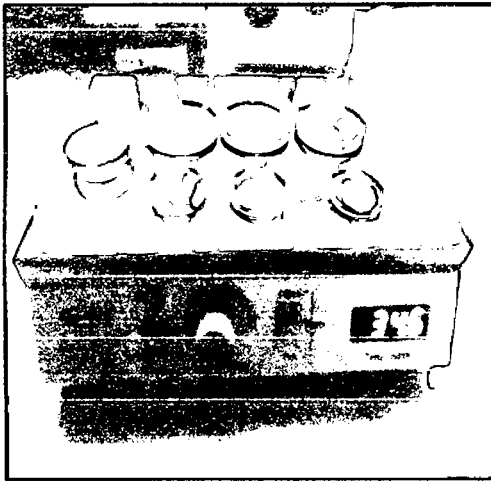
Aspiración folicular.



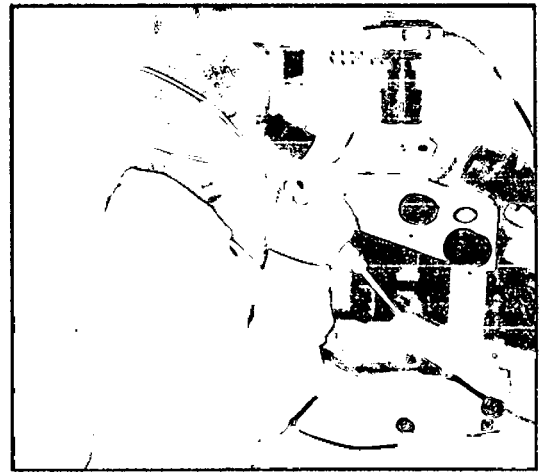
Sedimentación del líquido folicular



Resuspensión del pelet del líquido folicular



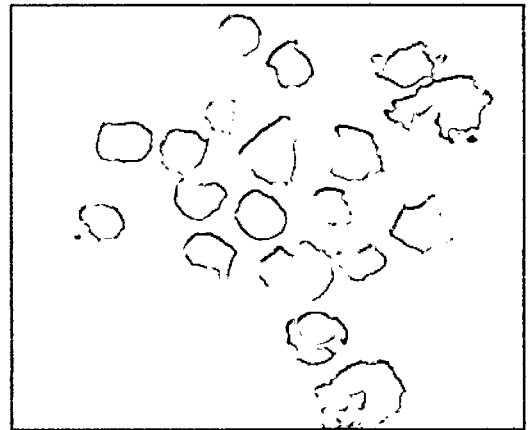
Ovocitos resuspendidos por diámetro folicular.



Búsqueda de ovocitos.



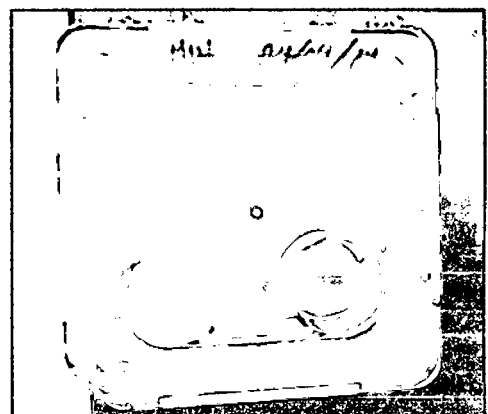
Lavado y selección de ovocitos.



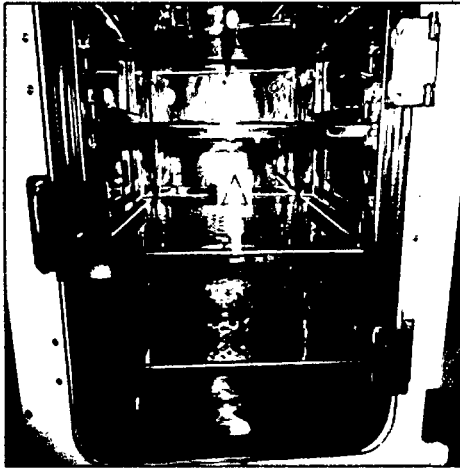
Ovocitos seleccionados para maduración.



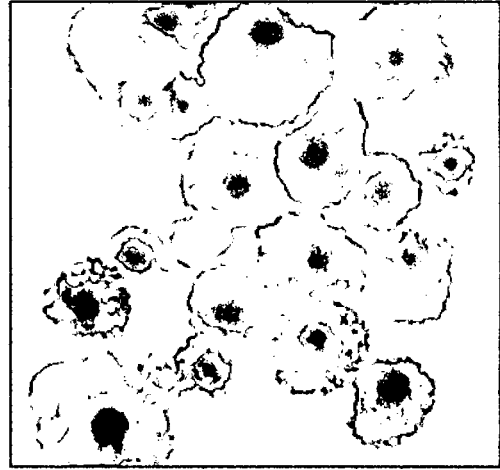
Preparación de medios.



Placa de 4 pocillos para la maduración y fecundación de ovocitos, y cultivo de cigotos.



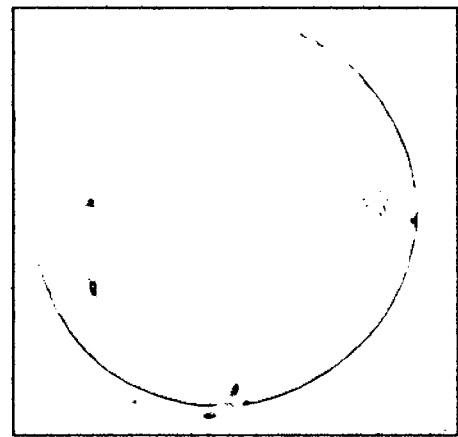
Encubadora de CO₂ para la maduración y fecundación de ovocitos, y cultivo de cigotos.



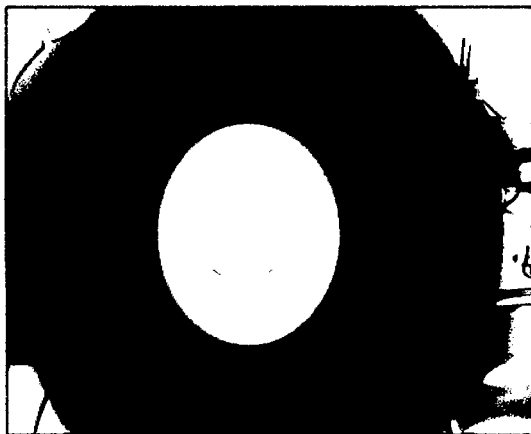
Ovocitos madurados por 24h.



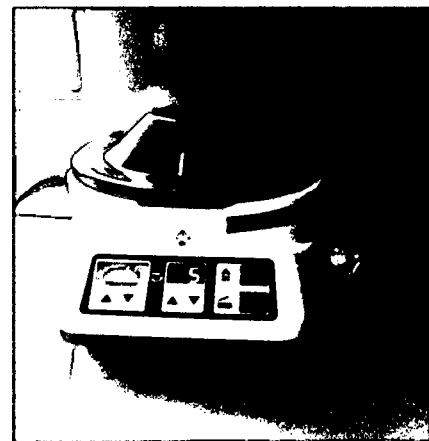
Fijación de ovocitos por 48h



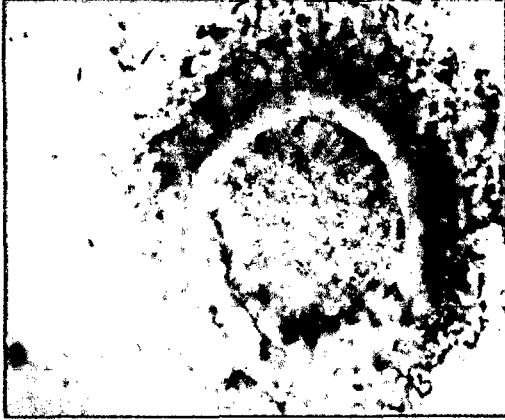
Tinción de ovocitos con aceto orceina



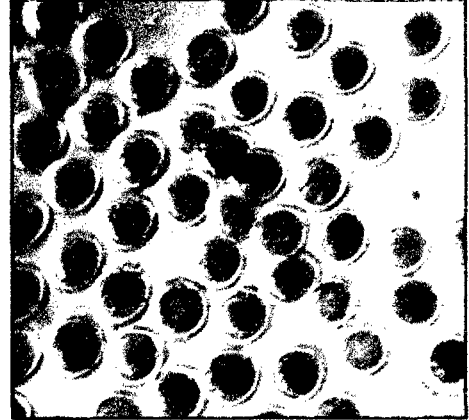
Evaluación en un microscopio del estado de maduración de los ovocitos.



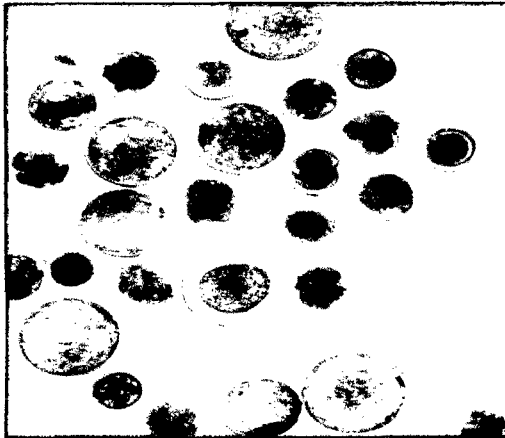
Centrifugado en el proceso de selección y capacitación espermática.



Unión de los espermatozoides con los ovocitos por 18 h.



Denudación de cigotos para cultivo por 7 días



Evaluación de embriones después de 7 días de cultivo