

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Maduración *in vitro* de ovocitos colectados *post mortem* de ovarios de vacas Holstein  
Friesian y Jersey.**

**Eduardo David Valencia Gonzaga**

Tesis de grado presentada como requisito  
para la obtención del título de BSc en Biotecnología

Quito, 2012

**Universidad San Francisco de Quito**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales.**

**HOJA DE APROBACION DE TESIS**

**Maduración in vitro de ovocitos colectados postmortem de ovarios de vacas Holstein**

**Friesian y Jersey.**

**Eduardo David Valencia Gonzaga.**

**Francisco Caiza de la Cueva, PhD.**

**Director de Tesis** .....

**María de Lourdes Torres, PhD.**

**Miembro de Comité de Tesis** .....

**Mario Caviedes, PhD.**

**Miembro de Comité de Tesis** .....

**Stella de la Torre, PhD.**

**Decana del Colegio de Ciencias** .....

**Biológicas y Ambientales**

Quito, 2012.

**©Derechos de Autor.**

Eduardo David Valencia Gonzaga.

2012.

## DEDICATORIA

*A la existencia,  
por permitirme ser en el tiempo.*

## AGRADECIMIENTOS

Mi más grande agradecimiento es para, mis padres por haber financiado este proyecto y siempre haberme apoyado oportunamente con mis metas. A mis hermanos Rocio, Sylvia y Javier por sus consejos y apoyo. A mi sobrina Camila por alegrar mis días.

Mi más grande sentido de respeto y gratitud a mi director de tesis, Francisco Caiza, porque, con su guía y consejo logré cumplir mis objetivos, superar todos los inconvenientes y por haber estado ahí en todo momento en el transcurso de este proyecto.

Como no agradecer:

A María de Lourdes Torres por todo su apoyo y guía durante mi formación Profesional, y así poder alcanzar mis objetivos.

A Mario Caviedes Por su colaboración al establecer el diseño experimental del proyecto, así como también, el análisis de resultados y oportunos consejos.

A Ricardo Alberio responsable del grupo de Biotecnología de la Reproducción de la EEA INTA Balcarce Argentina y a su grupo de trabajo, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y capacitarme un curso especial en su periodo de vacaciones.

A Manuel Baldeon, y su grupo de trabajo Martita, Estefy y Sarita por haberme abierto las puertas del laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina en el Hospital de los Valles y más que nada su interés y guía en el transcurso de la ejecución del proyecto.

A la empresa BIOGENSA y todo su personal, por haberme facilitado algunos materiales para el proyecto, y toda su colaboración.

A la empresa Spectrocrom, por haber realizado la importación del medio de cultivo de manera rápida y oportuna.

A Gabriel Trueba y Sonia Zapata por su colaboración con equipos para llevar a cabo los experimentos.

Al matadero del Cantón Mejía por haberme facilitado los ovarios para poder realizar los experimentos.

A mis amigos por haberme apoyado y soportado durante toda la mi carrera universitaria.

A todos mis profesores, que me supieron transmitir sus conocimientos para formarme profesionalmente.

Al maestro Jorge Luiz Gómez por haber sido una guía durante toda mi carrera universitaria.

Finalmente, a mi perro Tomás por ser mi fiel compañero.

David Valencia G.

## RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue desarrollar la técnica de Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de dos razas bovinas destinadas a matadero, y evaluar el efecto de la suplementación del medio TCM-199 con Suero Fetal Bovino (SFB) o *Epidermal Growth Factor* (EGF) y dos métodos de evaluación de la MIV: expansión de cummulus (EC) y aparición del primer corpúsculo polar (CP). Se trabajó con un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial  $2^2$  (4 tratamientos). Los ovarios bovinos fueron recuperados del matadero del cantón Mejía. La MIV se hizo a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación por 22-24h. Se pusieron a madurar 80 ovocitos, 40 pertenecientes a la raza Holstein Friesian y 40 a la raza Jersey. De estos maduraron 55 (68.75%) evaluados por EC y 59 (73.5%) evaluados por CP. La tasa de maduración para el medio TCM-199 +SFB fue de 62.5% para EC y 72.2% para CP, y para el medio TCM-199+EGF fue de 75% para EC y 75% para CP. La tasa de maduración para Holstein fue de 65% para EC y 80% para CP y para Jersey 72% (EC) y 67% (CP). Los ANOVA mostraron que no existen diferencias significativas entre tratamientos, medios ni razas. Este trabajo representa el primer intento de MIV en el Ecuador, cuyos resultados son similares a los reportados en otros trabajos, a pesar de haber trabajado a un grado y medio menos de temperatura. Esto abre las puertas para continuar con estudios de fertilización *in vitro* y criopreservación en bovinos, permitiéndonos estar a la par con respecto a los países de la región.

## ABSTRACT

The aim of this project was to develop the *in vitro* maturation (IVM) technique of cattle oocytes of two breeds (Holstein and Jersey) recovered from slaughterhouse, and to evaluate effects of supplementation the TCM-199 media with Fetal Calf Serum (FCS) or Epidermal Growth Factor (EGF) and two assessment methods of IVM: EC (Cummulus expansion) and CP (the come up of the first polar body). We worked with a completely Random Design (DCA) with factorial arrangement  $2^2$  (4 treatments). The bovine ovaries were recovered from the Mejia Canton slaughterhouse. The IVM was done at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and humidity to saturation in 22-24 hours. 80 immature oocytes (40 Holstein and 40 Jersey) were put under maturation. And from these 55(68.75%) evaluated by EC y 59 (73.75%) by CP, reached the maturation. The Maturation rate of TCM-199 + FCS was 62.5% by EC and 72.2% by CP, and TCM-199 + EGF was 75% by EC and 75% for CP. Maturation rate of Holstein breed was 65% under EC and 80% under CP and Jersey breed was 72% evaluating EC and 67.5% by CP. The ANOVA showed no significant differences between treatments, medium and breeds. This work represents the first attempt of IVM in Ecuador, and the results are similar to those reported in other works, despite having worked with one and a half degree less of temperature. This opens the door for further studies *in vitro* fertilization and cryopreservation in cattle, allowing us to be at par with respect to the countries of the region.



## INDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INDICE.....	vii
Lista de Tablas.....	xi
Lista de Gráficos.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1. Historia de la Fecundación <i>in vitro</i> (FIV).....	2
1.1.2. Importancia de la técnica de maduración de ovocitos relacionando con las biotecnologías y conservación de bancos de germoplasma.....	3
1.2. Fisiología de la maduración ovocitaria.....	6
1.2.1. Dinámica ovocitaria.....	6
1.3. Proceso de Maduración de ovocitos <i>in vitro</i> .....	8
1.3.1. Desarrollo de la técnica de obtención de ovocitos.....	8
1.3.2. Calidad del complejo cummulus-ovocito.....	10

1.3.3.	Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos .....	11
1.3.3.1.	Medios de maduración .....	12
1.4.	Bovinos .....	13
1.4.1.1.	Holstein- Friesian .....	13
1.4.1.2.	Jersey .....	14
2.	OBJETIVOS .....	15
2.1.	Objetivo General.....	15
2.2.	Objetivos específicos.....	15
3.	JUSTIFICACIÓN .....	16
4.	AREA DE ESTUDIO .....	18
5.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1.	Materiales .....	18
5.1.1.	Recuperación de ovarios .....	18
5.1.2.	Limpieza de ovarios.....	18
5.1.3.	Aspiración Folicular .....	19
5.1.4.	Preparación de medios .....	19
5.1.5.	Evaluación de ovocitos inmaduros .....	20
5.1.6.	Maduración Ovocitaria .....	20
5.1.7.	Evaluación de resultados .....	20
5.2.	Métodos .....	21

5.2.1.	Preparación de medios y soluciones stock.....	21
5.2.2.	Recuperación y limpieza de ovarios .....	21
5.2.3.	Aspiración Folicular .....	22
5.2.4.	Evaluación de ovocitos inmaduros .....	22
5.2.5.	Diseño experimental .....	23
5.2.6.	Maduración ovocitaria .....	24
5.2.7.	Evaluación de la maduración.....	24
6.	RESULTADOS .....	25
6.1.	Maduración ovocitaria.....	25
6.2.	Ovocitos madurados de las razas Holstein y Jersey, analizados por expansión de cummulus ophorus y aparición del primer corpúsculo polar .....	25
6.3.	Efectividad de los dos medios de maduración, analizados por expansión de cummulus ophorus y aparición del primer corpúsculo polar .....	26
6.4.	Análisis de varianza ANOVA. ....	26
6.4.1.	Análisis de Varianza ANOVA para EC.....	26
6.4.2.	Análisis de varianza ANOVA para CP.....	27
7.	DISCUSIÓN.....	28
8.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	32
8.1.	CONCLUSIONES.....	32
8.2.	RECOMENDACIONES .....	33

9. BIBLIOGRAFIA .....	35
Trabajos citados .....	35
10. GRÁFICOS .....	43
11. TABLAS .....	55
12. ANEXOS .....	60

## Lista de Tablas

Tabla 1. Hitos en la transferencia de embriones de animales de granja y técnicas relacionadas .....	55
Tabla 2. Hitos en FIV de mamíferos .....	56
Tabla 3. Parámetros de selección de ovocitos destinados a ser madurados <i>in vitro</i> .....	56
Tabla 4. Orden aleatorio de los tratamientos en sus cuatro repeticiones.....	57
Tabla 5. Resultados de maduración ovocitaria, por repetición, raza, y medio usado.....	57
Tabla 6. Tasa de maduración ovocitaria por raza.....	57
Tabla 7. Tasa de maduración con respecto al medio de maduración y el parámetro evaluado. ....	58
Tabla 8. Tabla de dos entradas para Expansión de cummulus ophorus .....	58
Tabla 9. Análisis de varianza para expansión de cummulus ophorus. ....	58
Tabla 10. Pruebas de significancia para expansión de cummulus ophorus.....	58
Tabla 11. Tabla de dos entradas para corpúsculo polar.....	59
Tabla 12. Análisis de Varianza para la aparición del primer corpúsculo polar.....	59
Tabla 13. Pruebas de significancia para aparición del primer corpúsculo polar. ....	59

## Lista de Gráficos

<b>Gráfico 1. Cambios estructurales en la maduración ovocitaria</b> .....	43
Gráfico 2. Cambios ultraestructurales del ovocito durante el crecimiento folicular .....	44
Gráfico 3. Acondicionamiento y limpieza de ovarios de vacas Holstein Friesian .....	45
Gráfico 4. Limpieza de restos de oviducto y trompas de Falopio de ovarios de vacas Holstein Friesian .....	45
Gráfico 5. Equipo de aspiración folicular adaptado para este proyecto .....	46
Gráfico 6. Ovarios previos a la aspiración folicular .....	46
Gráfico 7. Folículo antral previo a ser aspirado .....	47
Gráfico 8. Folículo antral después de la aspiración .....	47
Gráfico 9. Líquido folicular recuperado de los folículos antrales, mantenidos en tubos Falcom® .....	48
Gráfico 10. Tasa de expansión de cummulus en ovocitos MIV .....	48
Gráfico 11. Tasa de aparición de primer corpúsculo polar en ovocitos MIV .....	49
Gráfico 12. Tasa de maduración según parámetro observado: Medio + EC o CP .....	49
Gráfico 13. Ovocitos inmaduros primera repetición de raza Holstein. ....	50
Gráfico 14. Ovocitos Maduros de raza Jersey evaluado por CP de la primera repetición .....	50
Gráfico 15. Ovocito Maduro de Raza Holstein evaluado por CP con medio TCM-199 + EGF de la primera repetición .....	51
Gráfico 16. Ovocitos inmaduros segunda repetición de raza Jersey .....	51
Gráfico 17. Ovocito maduro de raza Jersey evaluado bajo EC de la segunda repetición con TCM-199 + EGF .....	52

Gráfico 18. Ovocitos maduros de Raza Holstein evaluados por CP con medio TCM-199 +SFB .....	52
Gráfico 19. Ovocitos inmaduros tratamientos 3 y 4 raza Holstein.....	53
Gráfico 20. Ejemplo de Ovocito inmaduro de baja calidad, no tomado en cuenta para el estudio.....	53
Gráfico 21. Expansión de Cummulus de ovocitos madurados de raza Holstein con TCM-199 + SFB .....	54
Gráfico 22. CP de ovocito maduro con TCM-199 + EGF cuarta repetición de raza Jersey .....	54

# 1. INTRODUCCIÓN

La mayor intervención del hombre en el pool genético de los animales domésticos fue a través de la domesticación. Ninguna otra medida productiva puede o podrá afectar el componente genético poblacional de forma tan completa (Palma & Brem, 1993). La domesticación es un proceso mediante el cual una población animal se adapta al hombre y a una situación de cautividad, a través de una serie de modificaciones genéticas que suceden en el curso de generaciones y a través de una serie de procesos de adaptación producidos por el ambiente y repetidos por generaciones (Mattiello, 1998).

La consecuencia más importante en la domesticación de los animales, en este caso del ganado vacuno, consistió en el cambio de sus ritmos y fisiología reproductiva. De esta manera, los ancestros salvajes se caracterizaron por una reproducción estacional muy marcada, mientras que los domesticados tienen menos marcada esta estacionalidad. Probablemente el ganado vacuno se domestica durante el periodo del 9000 al 7000 A.C. a partir del *Bos primigenius* en la zona de Palestina (Domínguez, 2007; Mattiello, 1998).

El uro (*Bos primigenius*) que es considerado el fundador del linaje de todos los bovinos modernos, era de hecho un animal de dimensiones notables. Presentaba formas similares a las de los bovinos actuales, pero podía alcanzar 1 ó 2 metros de altura y tenía largos cuernos en forma de lira (Mattiello, 1998).

## 1.1. Antecedentes

Las biotecnologías reproductivas actualmente en uso en la producción de bovinos han sido desarrolladas durante el siglo XX. En la década de los 70 se produjo el desarrollo e



incorporación de la Superovulación y Transferencia de Embriones (SOTE) a los programas de mejora genética y en términos generales, tuvo el mismo objetivo en las hembras que la inseminación artificial (IA) respecto de los machos: multiplicar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético (Alberio R. , 2003). Durante la década de los 80 se desarrolló una tecnología alternativa o complementaria a la anterior, la producción *in vitro* (PIV) de embriones a la que se visualizó como una buena forma de mejorar algunos puntos débiles de la SOTE y aún en algún momento a remplazarla en buena medida (Alberio, 2003).

### **1.1.1. Historia de la Fecundación *in vitro* (FIV)**

La historia de la FIV tiene sus orígenes a finales del siglo XIX (Álvarez, 2007). Los primeros ensayos en FIV se remontan a 1890, en donde, Heape transfirió exitosamente embriones de conejo (Álvarez, 2007; Gordon , 2003). Posterior a esto, Heape recuperó dos embriones al lavar las trompas de una coneja fecundada horas antes y luego los transfirió a las trompas de una coneja de raza belga; de estos embriones nacieron seis conejos completamente sanos (Álvarez, 2007). Por otro lado, existen quienes consideran que la historia de la reproducción asistida se remonta a 1878 cuando el biólogo alemán Schenck intentó fecundar *in vitro* sin éxito óvulos de coneja y cobaya (Tarasco, 1996; Bavister, 2002). No obstante, durante mucho tiempo persistieron las dudas sobre los resultados exitosos de la fecundación *in vitro* en animales y fue hasta 1959 cuando se comprobaron inequívocamente los resultados de FIV, gracias a los experimentos de Chang también en conejos (Álvarez, 2007; Tarasco, 1996; Gordon , 2003). Gracias a los estudios de Heape, los científicos se mostraron más interesados en

la posibilidad de cultivar embriones en laboratorio y poco a poco fue perfeccionándose el estudio del desarrollo embrionario temprano, campo que evolucionó rápidamente, tal y como se observa en las Tablas 1 y 2 y en el Anexo 1 en donde se presenta una visión más amplia, con respecto a las técnicas de reproducción asistida.

Con respecto a lo realizado en bovinos tenemos que, uno de los primeros intentos para fertilizar artificialmente ovocitos bovinos maduros *in vitro* fue reportado por Sreenan en Irlanda, con esperma pre-incubado de toro (Gordon , 2003). De entre los primeros trabajos sobre maduración *in vitro* de ovocitos bovinos tenemos a los publicados por EDWARDS en el año 1965 (Palma & Brem, 1993; Yul & Cheng, 1998). El primer éxito de FIV a partir de un ovocito bovino madurado artificialmente fue gracias a los esfuerzos de Iritani y Niwa (1977) Japón (Gordon , 2003). Finalmente tenemos que, el primer ternero producto de la FIV nació en el año 1981 (Palma, 1993), procedente de un embrión producido *in vitro* (Herrandón & Col, 2007).

### **1.1.2. Importancia de la técnica de maduración de ovocitos relacionando con las biotecnologías y conservación de bancos de germoplasma.**

*“La diversidad genética entre los animales merece ser preservada para las generaciones futuras del mismo modo que el arte y la arquitectura” (Comte, 1991).*

Las poblaciones que tienen rasgos genéticos particulares y únicos se denominan recursos genéticos. Con base en el valor de uso que tienen los recursos genéticos, las poblaciones de animales domésticos y de especies silvestres relacionadas deben ser preservadas (Segura & Montes , 2001).

Consecuentemente, los problemas a que se enfrentan los recursos genéticos animales en el mundo son según expertos de la FAO: 1) la disminución de la variabilidad genética dentro de razas; esto es básicamente un problema de las razas o líneas altamente productivas mantenidas en zonas templadas y empleadas en sistemas intensivos de producción; 2) la rápida desaparición de razas locales y líneas de animales domésticos a través de la introducción de razas exóticas y 3) los climas cálidos y húmedos y otros ambientes hostiles comunes a los países en desarrollo (Segura & Montes , 2001). En la actualidad, ya se ha perdido variabilidad genética en la especie bovina, con la extinción del *Bos primigenius*, el fundador del linaje de todos los bovinos (Kerkdijk, 2010; Mattiello, 1998). Por esta razón, el ganado bovino ha sido considerado, en programas de conservación, para evitar la pérdida de variabilidad genética (Segura & Montes , 2001).

Una clara ejemplificación, de lo que ocurre en el ganado bovino es que, cuando se seleccionan individuos buscando determinados rasgos que respondan a las necesidades de una producción especializada (por ejemplo, eligiendo a los animales más productores de huevos, leche o carne), se descartan otras características, como la adaptabilidad al clima, la resistencia a ciertas enfermedades o la capacidad para vivir con los recursos locales (Segura & Montes , 2001).

Es así que, en los últimos años las técnicas sobre la colección, almacenamiento y transferencia de embriones de bovinos, han sido simplificadas considerablemente con el desarrollo de técnicas no quirúrgicas y métodos para conservar embriones (Segura & Montes , 2001). Adicionalmente, la criopreservación ha sido utilizada como un método de almacenamiento de material genético en algunos animales domésticos amenazados de extinción. La criopreservación de embriones mamíferos se inició en 1972 (Segura & Montes , 2001). Otra técnica de criopreservación, que parece ser más prometedora que la conservación de los embriones en nitrógeno líquido, es la vitrificación (Segura & Montes , 2001). La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones logrado por una elevación extrema en viscosidad del medio durante el enfriamiento (Segura & Montes , 2001; Celestinos & Gatica, 2002).

El interés en preservar ovocitos usando técnicas criogénicas ha aumentado con la creciente importancia en la PIV de embriones, la transferencia nuclear y el almacenamiento de información en los bancos de genes (Ruiz & Correa, 2007). El almacenamiento de embriones, permitiría que una línea o raza se reconstituyera en una sola generación, mientras que, el almacenamiento de semen necesitaría de varias generaciones de retrocruzas (Segura & Montes , 2001).

Una alternativa para que los programas de criopreservación sean aplicados a gran escala es la obtención de ovocitos maduros a partir de la recuperación de ovocitos inmaduros de animales sacrificados (Segura & Montes , 2001). Adicionalmente, en el ganado vacuno la obtención de ovocitos para su posterior FIV, a partir de animales

impúberes posee un elevado interés dentro de los programas de mejora genética, al posibilitar la disminución del intervalo generacional y por tanto acelerar la ganancia genética (De la Fuente & Col., 1996).

## **1.2. Fisiología de la maduración ovocitaria.**

Los ovarios de los mamíferos contienen folículos que se encuentran en diferentes estadios de desarrollo, de los cuales solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal (Fernandez, Hernandez & Reyes, 2010). La técnica de maduración ovocitaria *in vitro*, ofrece la posibilidad de convertir a la hembra en productora de gametos, equiparándola cuantitativamente a los machos productores de semen para la IA (Herrandón & Col, 2007). Los ovocitos bovinos inmaduros permanecen en profase meiótica I dentro de los folículos ováricos, pero cuando son removidos de éstos y cultivados *in vitro* bajo condiciones adecuadas, reanudan la meiosis espontáneamente y aproximadamente 90% de ellos alcanzan la etapa de metafase II (Ahuja & Col., 2009).

### **1.2.1. Dinámica ovocitaria**

La capacidad de un ovocito en ser fertilizado se refiere al desarrollo que este adquiere durante el estadio preovulatorio de la maduración meiótica (Blerkom, Bell & Weipz, 1990; Barrett & Albertini, 2010). Durante el proceso de maduración, cambios importantes ocurren a nivel nuclear y citoplasmático los cuales preparan al ovocito para su fertilización y el desarrollo temprano del embrión. Las comunicaciones intercelulares entre las células del cummulus ophorus y los ovocitos, son fundamentales para la

maduración del ovocito (Ocaña & Col, 1999). Es así que, la maduración del ovocito es definida como la re-entrada en la meiosis que ocurre previo a la ovulación y la subsecuente fertilización (Jamnongjit & Hammes, 2005; Yul & Cheng, 1998).

En cuanto a la dinámica hormonal, la maduración del ovocito, se encuentra comandada por la exposición folicular de LH<sup>1</sup>, hormona que promueve la expansión del cummulus y la maduración del ovocito, esto a pesar que, ni el ovocito ni las células de cummulus poseen receptores de LH, razón por la cual, se cree que son factores parácrinos los que intervienen en este caso. Estudios recientes, muestran que pueden ser los miembros de la familia del *Epidermal Growth Factor* (EGF) quienes están involucrados en la maduración, pero su comportamiento en cuanto a la expansión del cummulus y a la subsecuente maduración del ovocito no ha sido claramente establecida (Jamnongjit & Hammes, 2005). Un esquema de esta serie de eventos se observan en el Gráfico 1.

El desarrollo del folículo secundario se caracteriza por la formación de la Zona Pelucida (ZP) y los gránulos corticales. A continuación, la transición al estadio antral temprano, se caracteriza por una marcada proliferación de células de granulosa, acompañada de la formación del antro y un encascaramiento completo del ovocito por la ZP. Adicionalmente, mitocondrias alargadas se vuelven más abundantes y distribuidas a través del ooplasma<sup>2</sup>, gotas lipídicas, vesículas, y complejos de Golgi incrementan su cantidad (Gordon , 2003) (Gráfico 2).

---

<sup>1</sup> LH: Hormona luteinizante

<sup>2</sup> Ooplasma: Citoplasma del ovocito (Gordon , 2003)

### 1.3. Proceso de Maduración de ovocitos *in vitro*

#### 1.3.1. Desarrollo de la técnica de obtención de ovocitos

La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se tornarían en folículos atrésicos<sup>3</sup>, con el fin de aprovechar el máximo potencial genético de una donadora por procedimiento *in vitro* (Fernandez, Hernandez & Reyes, 2010). El número de ovocitos que se pueden madurar *in vivo*, se ve limitado gracias al *feedback* de la regulación endocrina del crecimiento del folículo con el proceso de maduración (Hashimoto, 2009).

El eje central de la reproducción asistida es la calidad del ovocito, ya que uno de los mayores inconvenientes encontrados ha sido reconocer el estadio de maduración de los ovocitos, en donde el citoplasma juega un papel importante. El factor limitante para la colección de Complejo Cumulus-Ovocito (COC) es indudablemente el tamaño de los folículos de los cuales se extraen. (Fernandez, Hernandez & Reyes, 2010; Shirazi & Col., 2010). Varios estudios realizados con ovarios de matadero han demostrado una notable relación entre el tamaño del folículo y la calidad del ovocito, por lo tanto, ovocitos recuperados de folículos mayores a 6 mm de diámetro demostraron desarrollo superior que los de folículos de menor tamaño (Gordon , 2003).

La obtención de ovocitos se realiza a través de dos procesos básicos: a partir de hembras sacrificadas de matadero, mediante la obtención de sus ovarios y la aspiración de los folículos; o a partir de animales vivos utilizando la aspiración transvaginal ecoguiada (OPU- del inglés *Ovum Pick Up*) (Herrandón & Col, 2007; Gordon , 2003). Otra técnica

---

<sup>3</sup>**Folículo atrésico:** folículo destinado a apoptosis, en cualquier estadio del desarrollo folicular (Gordon , 2003).

de obtención de ovocitos que se usa también para recuperar ovocitos de vacas destinadas a matadero, es la de *slicing*<sup>4</sup>, pero al hacer una comparación de eficacia con respecto a la técnica de aspiración, los reportes concluyen que, se obtiene mayor cantidad de ovocitos con la técnica de *slicing*, pero el daño físico que genera esta técnica en los ovocitos hace que la cantidad de los que se pueden utilizar disminuya notablemente. Por esta razón, la técnica de aspiración es más eficiente, en cuanto a calidad y cantidad final de ovocitos que se pueden destinar a maduración *in vitro* (Gordon , 2003).

En términos generales, la etapa de recuperación de ovocitos puede asimilarse a lo que se realiza en el macho, la colecta de la gameta masculina (espermatozoide), que es la primera etapa del proceso de IA (Alberio, 2003).

Por cada vaca (se obtienen 2 ovarios recuperados) se pueden obtener de entre 15 a 20 óvulos, lo que permitirá obtener de 4 a 6 embriones para transferir. La técnica de recuperar ovocitos de ovarios de vacas destinadas a matadero resulta más eficiente en la producción de embriones que la técnica de superovulación, en un periodo de tiempo considerable (Aller, 2004).

De las técnicas mencionadas para la recuperación de COCs, las más usadas son: por aspiración de folículos antrales (Al-Amin, Nahar, & Ali, 2007; Sagirkaya & Col., 2004; Marei, Wathes, & Fouladi , 2009), a una presión controlada , ya sea utilizando jeringuillas o sistemas de absorción por presión, siendo esta técnica la más ampliamente usada; y por OPU (Tamassia & Col., 2003; Gordon , 2003; Rizos & Col., 2002).

La calidad del ovocito se ve afectada por factores animales y/o ambientales. Dentro de los animales se encuentran: la edad del animal, en donde el mayor problema se encuentra

---

<sup>4</sup> *Slicing*: técnica que se basa en realizar varios cortes a los ovarios y hacer lavados con solución fisiológica para recuperar los ovocitos (Gordon , 2003).



en las vacas muy jóvenes o muy viejas, lo que no implica que no se puede realizar la MIV ya que existen reportes de MIV a estas edades extremas e incluso se han sometido a maduración ovocitos recuperados de fetos, pero con un bajo porcentaje de MIV (Gordon , 2003). Otro factor es la categoría del animal, es decir si son vacas o vaquillonas; el estado del ciclo estral; y la condición corporal. Por otro lado, los factores ambientales: la temperatura, cantidad de luz por día y la estación del año (Gordon , 2003).

La selección de los ovocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea, adicionalmente, los ovocitos rodeados por un cúmulo compacto formado por varias capas de células, presentan mayores porcentajes de maduración (Herrandón & Col, 2007).

### **1.3.2. Calidad del complejo cummulus-ovocito**

La calidad de los COCs que van a ser sometidos a FIV es importante para asegurar la maduración, su posterior fertilización y cultivo in vitro, de esta manera en la Tabla 3 se observa los parámetros más comúnmente usados para definir la calidad de los ovocitos recuperados, todos estos parámetros son subjetivos ya que dependen de apreciación visual, y esto podría variar de individuo a individuo (Gordon , 2003).

La apreciación de características morfológicas son la base de diversos esquemas de clasificación, basados en la compactación, estructuras celulares, entre otras características visibles bajo estéreo microscopio (Gordon , 2003).

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

En el curso normal de eventos, la habilidad del ovocito para desarrollarse en un embrión viable y eventualmente en un feto normal y saludable es adquirida gradualmente durante su diferenciación progresiva a través de la foliculogénesis, proceso que culmina en un estadio de competencia del desarrollo, proceso que se ha denominado “Capacitación del ovocito”. (Gordon , 2003).

El objetivo de la MIV de ovocitos, es producirlos con calidad comparable a los obtenidos *in vivo* (Fernandez, Hernandez, & Reyes, 2010). La MIV constituye una etapa decisiva en el rendimiento del proceso de producción de embriones *in vitro*. Sin embargo, se le ha presentado una escasa atención, ya que muchos laboratorios continúan empleando el procedimiento descrito por Fukui y Ono en 1989, consistente en cultivar durante 24 horas los ovocitos inmaduros en medio TCM-199 (en la siguiente sección encontraremos una revisión más detallada del medio), suplementado con 10% de suero fetal, Gonadotropinas (FSH y LH), y 17  $\beta$ -estradiol, a una temperatura de 38,5 °C en una atmosfera con un 5% de CO<sub>2</sub> en aire (Herrandón & Col, 2007). Claro está que hoy por hoy, se manejan algunas variaciones, pero las bases del método son las mismas desarrolladas por Fukui y Ono (1989).

Los ovocitos bovinos inmaduros permanecen en profase meiótica I dentro de los folículos ováricos, pero cuando son removidos de éstos y cultivados *in vitro* bajo condiciones adecuadas, reanudan la meiosis espontáneamente y aproximadamente el 90% de ellos alcanzan la etapa de metafase II (Ahuja & Col., 2009), y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas de comenzada la maduración, de estos el 80% es

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

### **1.3.3.1. Medios de maduración**

Los medios de cultivo utilizados en ganado para MIV pueden ser ampliamente divididos en simples y complejos. Los medios simples son usualmente sistemas de *buffer* de bicarbonato, que contienen sales fisiológicas básicas con la adición de piruvato, lactato y glucosa. La principal diferencia entre varias formulaciones de medios simples se encuentran en diferencias en la concentración de iones y los niveles de las fuentes de energía. Por otro lado los medios complejos, contienen adicionalmente aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias. Es necesario poner atención, en los medios de maduración al manejo de otros factores como en el pH, la osmolaridad, la temperatura, la fase gaseosa, la humedad y el tiempo de maduración (Gordon , 2003).

Los medios de maduración son generalmente enriquecidos con una gran diversidad de suplementos, tanto séricos como hormonales, que favorecen la capacidad del ovocito para madurar *in vitro* (Ocaña & Col, 1997; Gordon , 2003). El agua es el componente mayoritario en el medio para MIV, es así que, un agua de buena calidad es esencial para la preparación del medio (Gordon , 2003; Mucci & Col., 2006).

La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO<sub>2</sub> en aire para la maduración, esto por su similitud a los porcentajes registrados en el oviducto de algunas hembras mamíferas (Mucci & Col., 2006; Hashimoto, 2009).

El medio de maduración TCM-199 (por sus siglas en inglés: *Tissue culture medium*), es un medio complejo que utiliza como *Buffer* al bicarbonato o a HEPES y es comúnmente suplementado con diferentes tipos de sueros, y/o hormonas (gonadotropinas y/o esteroides) (Gordon , 2003). Es el más ampliamente usado para estudios de la maduración de ovocitos bovinos (Kauffold & Col., 2005; Chohan & Hunter, 2003; Al-Amin, Nahar, & Ali, 2007); su composición se describe en los Anexos 2 y 3. Los aditivos más comunes usados para MIV de ovocitos en TCM-199 son FSH<sup>5</sup>, LH<sup>6</sup>, suero fetal bovino (SFB), y recientemente algunos factores de crecimiento como *epidermal growth factor* (EGF) e *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) (Sagirkaya & Col., 2004)

## 1.4. Bovinos

Los bovinos son animales vertebrados, mamíferos ungulados. Pertenecen a la familia de los bóvidos y al género **Bos**. Existen las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*. A la especie *Bos taurus* pertenecen los bovinos sin joroba, como el tipo europeo. El *Bos indicus* es el bovino con joroba, como el cebú (Koeslag & Col, 2008).

### 1.4.1.1. Holstein- Friesian

El ganado Holstein- Friesian tiene su origen en Holanda. En los países europeos se le encuentra como animal de doble propósito (Carne o Leche). En Estados Unidos se desarrolló un tipo con mayor producción de leche, que luego fue distribuido en América Latina. El color característico de la raza Holstein es blanco manchado de negro. En ocasiones se ven ejemplares con manchas rojas. El peso promedio de las hembras es de

---

<sup>5</sup> Hormona Folículo estimulante

<sup>6</sup> Hormona Luteinizante

600 a 650 Kg, los machos tienen siempre pesos superiores, llegando a los 1200Kg. En general, los animales de esta raza son dóciles y fáciles de manejar. Por otro lado, las vacas de esta raza son las mejores productoras de leche, pero el contenido de grasa butírica de la leche no es muy alto (Koeslag & Col, 2008).

#### **1.4.1.2. Jersey**

El ganado Jersey es de la isla del mismo nombre, situada en el Canal de la Mancha, entre Inglaterra y Francia. Esta raza es la más pequeña de las razas lecheras europeas. Sin embargo, son animales de gran capacidad de producción de leche y especialmente de grasa butírica. Por esta característica, la raza Jersey se usa con frecuencia para producir leche destinada a la elaboración de productos lácteos, tales como queso, crema y mantequilla. Los animales adultos no alcanzan pesos altos, en promedio las vacas pesan de 400 a 500 kg y los toros, de 500 a 700 kg. Los sementales pueden ser peligrosos y difíciles de manejar (Koeslag & Col, 2008).

En el presente estudio se desarrolló la técnica de MIV de ovocitos bovinos de las razas Holstein Friesian y Jersey. Se utilizó el medio de maduración TCM-199 con el buffer HEPES (Sigma-Aldrich® Case: M7528) y suplementado con SFB o EGF. Las condiciones de maduración fueron: oscuridad, 37°C, humedad a saturación y 5% de CO<sub>2</sub> por un periodo de 22-24 horas. La maduración de los ovocitos bovinos fue evaluada bajo dos parámetros: la expansión de *cumulus ophorus* y la aparición del primer corpúsculo polar.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Desarrollar la técnica de maduración de ovocitos bovinos *in vitro* destinados a ser fertilizados para producción de embriones *in vitro*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- a) Evaluar las características de maduración de ovocitos de dos razas bovinas (Holstein Frisian y Jersey).
- b) Determinar las variaciones de maduración obtenidas con el medio TCM-199 utilizando o no suero fetal en su composición.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto nace frente a la necesidad de cubrir el vacío existente en el Ecuador, sobre la investigación de técnicas de reproducción asistida en animales. Lo que nos ha llevado a ser un país importador de embriones bovinos, incurriendo en costos elevados, problemas de adaptación de los animales nacidos y un retraso tecnológico de alrededor de 20 años en este tipo de técnicas.

A nivel mundial se ha observado que, la tasa de ganancia genética en producción de leche alcanza el 1.5% por año, gracias al uso eficaz de la inseminación artificial (IA), a las pruebas de progenie, y a la intensa selección de los toros para su uso a nivel mundial (Rodríguez-Martínez, 2008). Los datos estadísticos publicados por la IETS (del inglés *International Embryo Transfer Society*) indican que durante el año 2003 se obtuvieron 330000 embriones bovinos a nivel mundial mediante FIV, de los que fueron transferidos 106200, lo que representa el 14.2% del total de los embriones transferidos (Herrandón & Col, 2007).

Por lo tanto, este estudio constituye el primer reporte de la técnica de MIV de ovocitos bovinos y es el punto de partida para más investigaciones relacionadas, ya que se considera que la mejor manera de mejorar la calidad de los embriones PIV es mejorar la calidad del ovocito colectado (Yul & Cheng, 1998; Hernández, Navaja & Vílchez, 2010). Esta técnica constituye la primera etapa de PIV de embriones y tiene aplicaciones inmediatas en la producción a gran escala de embriones, para el mejoramiento genético de las poblaciones bovinas, lo que beneficiaría económicamente al país ya que contribuye con una mayor

productividad de vacas lecheras o de carne y más aún se puede lograr que el país se convierta en exportador de embriones (Fernández, Bastidas & Trocóniz, 1997).



## **4. AREA DE ESTUDIO**

Los ovarios bovinos usados fueron recuperados del Matadero del cantón Mejía ubicado en Machachi, y se trabajó con los ovarios de: 31 vacas Holstein Friesian y 31 Jersey. El desarrollo de este proyecto, se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la facultad medicina de la Universidad San Francisco de Quito en el Hospital de los Valles, durante los meses de julio y agosto del 2011.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Materiales**

#### **5.1.1. Recuperación de ovarios**

- Termos de boca ancha
- Fundas Ziplock®
- Gafas

#### **5.1.2. Limpieza de ovarios**

- Vaso de precipitación 600mL
- Frascos con tapa de 500mL
- Solución Fisiológica 0.9%, LIFE®
- Gentamicina, MK®
- Ovarios de vacas Holstein Friesian y Jersey

### 5.1.3. Aspiración Folicular

- Tubos Falcom<sup>®</sup> 15mL
- Equipo de aspiración (adaptado para este trabajo, ver Gráfico 6)
- Jeringuilla de insulina
- Solución Fisiológica 0.9%, LIFE<sup>®</sup>, suplementado con 5% de Gentamicina
- Equipo de infusión peri-craneal con agujas 21G
- Alcohol 70%

### 5.1.4. Preparación de medios

- Cámara de flujo laminar NUAIRE<sup>®</sup>
- Pipetas
- Jeringuillas 10mL
- Micropipetas
- Tubos ependorf<sup>®</sup> de 1,5 mL
- Tubos Falcom<sup>®</sup> 15mL
- Balanza Mettler Toledo PR1203
- Alcohol 70%
- Medio TCM -199, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (Case: M7528)
- L-Glutamina
- Suero Fetal Bovino
- *Ephidermal Growth Factor*

### **5.1.5. Evaluación de ovocitos inmaduros**

- Estereomicroscópio de 20X OLYMPUS®
- Micropipetas
- Pipetas Pasteur
- Placas de búsqueda
- Cajas de 4 pozos tipo Nunc®
- Microscopio LW Scientific®
- Medio TCM-199 + SFB+ Gen
- Medio TCM-199 +EGF+ Gen
- Ovocitos bovinos inmaduros (Razas Holstein Friesian y Jersey)

### **5.1.6. Maduración Ovocitaria**

- Cámara de CO<sub>2</sub> Thermo Scientific®
- Alcohol 70%

### **5.1.7. Evaluación de resultados**

- Estereomicroscópio 20X OLYMPUS®
- Microscópio invertido Leitz Wetzlar® 601353
- Capilares

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Preparación de medios y soluciones stock**

El medio TCM-199 suplementado con HEPES Sigma-aldrich<sup>®</sup> (*case*: M7528) en su presentación de 500 mL, se reconstituyó con la adición de 50mg de L-Glutamina, luego se fraccionó 9 y 10 ml de medio en tubos Falcom<sup>®</sup> de 15mL. Los tubos se cubrieron con papel aluminio, y se puso a refrigeración a 4-6°C.

Se realizaron alícuotas de 1mL de SFB inactivado en tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 1,5mL y se puso a refrigeración a 4-6°C. Con el EGF, las alícuotas fueron de 200µL en tubos Eppendorf<sup>®</sup> y se pusieron a congelar a -80°C. Finalmente, a la solución fisiológica se le agregó un 5% de gentamicina y se conservó en refrigeración a 4-6°C. Se siguió los protocolos utilizados en la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA INTA) Balcarce- Argentina.

### **5.2.2. Recuperación y limpieza de ovarios**

Los ovarios bovinos fueron separados por su raza, en fundas Ziplock<sup>®</sup> y se colocaron en termos de boca ancha a temperatura ambiente. De esta manera, fueron transportados al laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la facultad de medicina en el Hospital de los Valles. En el laboratorio, los ovarios fueron puestos en solución fisiológica al 0.9% y con 5% de gentamicina a temperatura ambiente en vasos de precipitación de 600mL, se realizaron 3 lavados en la misma solución y se retiraron impurezas, como restos de oviducto y trompas de Falopio (Gráficos 3 y 4).

### **5.2.3. Aspiración Folicular**

Primero, se adaptó a tubos Falcom<sup>®</sup> de 15mL para que recolecten los ovocitos usando una bomba de vacío y la ayuda de un equipo de infusión pericraneal, tal como se ve en el Gráfico 5. La presión de absorción se fijó a 100mmHg. Los ovarios se dejaron en solución fisiológica al 0.9% y con 5% de gentamicina a temperatura ambiente, en vasos de precipitación de 600mL tapados con papel aluminio, hasta el momento de su aspiración (Gráfico 6). Se aspiraron ovocitos de folículos antrales de 2-6mm, de todos los ovarios (Gráficos 7 y 8), y el líquido folicular resultante fue conservado en tubos Falcom<sup>®</sup> de 15mL, como se observa en el Gráfico 9.

### **5.2.4. Evaluación de ovocitos inmaduros**

Se añadió 1ml de SFB a 9mL de medio TCM-199 en tubos Falcom<sup>®</sup> previamente alicuotados, para alcanzar un volumen final de 10 mL. Se agregó 100µL de EGF a 10mL medio TCM-199 en los tubos Falcom<sup>®</sup>. A los tubos se les llevó a la cámara de CO<sub>2</sub> a 37°C, para que el medio se estabilice y no produzca daño a los ovocitos por shock térmico. Por otro lado, el líquido folicular que contenía a los ovocitos se dejó reposar en los tubos Falcom<sup>®</sup> de 15mL por al menos 10 minutos, esto para que los ovocitos contenidos en el líquido folicular se precipiten al fondo del tubo.

Posteriormente, en una caja de cuatro pozos tipo Nunc<sup>®</sup> se puso 1 mL de medio con SFB o EGF por cuatro veces, según el tratamiento que se realizó (combinación del medio más las raza Holstein o Jersey). Inmediatamente, con una pipeta Pasteur se tomó el precipitado que contiene a los ovocitos y se colocó en una placa de búsqueda, a esto se le

agregó 100  $\mu$ L del líquido folicular del sobrenadante para reducir la turbidez y facilitar la búsqueda. Se llevó a la placa bajo estereomicroscopio a 20X, se seleccionaron todos los ovocitos disponibles con una micropipeta de 0.5  $\mu$ L y se pusieron en el primer pozo de la caja de 4 pozos, a estos ovocitos, se les volvió a recuperar y se hizo pasajes hasta el cuarto pozo, para reducir restos celulares que podían acompañar al ovocito. Los ovocitos se evaluaron siguiendo los parámetros de la Tabla 3, y se seleccionaron los de clase I y II.

### **5.2.5. Diseño experimental**

En el proyecto se manejaron 2 factores: A (Raza: Holstein y Jersey) y B (Medio: TCM 199 + SFB y TCM-199 + EGF. En cuanto, a las variables tenemos: al número de ovocitos madurados (relación de ovocitos madurados vs. a ovocitos no madurados); e indicadores de maduración como: expansión del *cummulus oophorus* y presencia del corpúsculo polar (Totey & Col, 1992; Ocaña & Col, 1999).

En consecuencia, el diseño es un Diseño Experimental Completamente Aleatorizado (DCA) con arreglo factorial  $2^2 = 4$  tratamientos y 4 repeticiones lo que nos da 16 unidades experimentales, con un total de 20 ovocitos por repetición.

En donde tenemos los siguientes tratamientos:

1. H + TCM 199 con SFB
2. H + TCM 199 con EGF
3. J + TCM 199 con SFB
4. J + TCM 199 con EGF

E el orden al azar de las repeticiones se observa en la Tabla 4.

### **5.2.6. Maduración ovocitaria**

Los ovocitos bovinos destinados a ser madurados, fueron puestos en una caja de cuatro pozos tipo Nunc<sup>®</sup>, 5 ovocitos por pocillo, con 600µL de medio de maduración, siguiendo el orden al azar del diseño experimental. Posteriormente, se llevaron las cajas a la cámara de maduración con 5% de CO<sub>2</sub>, humedad a saturación, por 22-24 horas a 37°C, (Gordon , 2003; Alberio R., 2003; Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. INTA Balcarce). El mismo procedimiento se realizo para cada repetición.

### **5.2.7. Evaluación de la maduración**

La evaluación de la maduración de los ovocitos, se realizó transcurridas 22 horas de maduración en la cámara de CO<sub>2</sub>, en donde, se tomaron las cajas según el orden en que se pusieron a madurar. Para determinar, si los ovocitos se maduraron o no, se utilizaron dos parámetros: la expansión de *cummulus ophorus*, esto por observación, bajo estéreomicroscopio y microscopio invertido. El otro parámetro fue, a través de la observación de la presencia del primer corpúsculo polar, para lo que se tomó a los mismos ovocitos evaluados con el método anterior, y se los sometió a un prominente pipeteo por aproximadamente un minuto, para retirar las células de *cummulus* y así se facilitó la observación del corpúsculo polar. Luego fueron observados bajo estereomicroscopio y microscopio invertido y la ayuda de un microcapilar preparado a partir de un capilar. Se tomaron fotografías de los mejores ejemplares.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Maduración ovocitaria**

Los ovocitos bovinos recolectados post-mortem, sometidos a la técnica de maduración *in vitro*, se evaluaron bajo dos parámetros, EC y CP. De un total 80 ovocitos puestos a madurar, en las cuatro repeticiones, 40 de raza Holstein y 40 Jersey; maduraron en total 55 ovocitos evaluados bajo EC y 59 ovocitos bajo CP, lo que representa un 68.75% y 73.75% respectivamente (Tabla 5).

### **6.2. Ovocitos madurados de las razas Holstein y Jersey, analizados por expansión de cummulus ophorus y aparición del primer corpúsculo polar**

En cuanto a la, maduración ovocitaria *in vitro* evaluada bajo EC y CP, con respecto a las razas, tenemos que, para la raza Holstein maduraron 26 ovocitos evaluados bajo EC, lo cual representa un 65% de la maduración *in vitro*. Mientras que, para los mismos ovocitos evaluados bajo CP se observó que 32 ovocitos maduraron y esto representa un 80% de la maduración *in vitro*. Por otro lado, para la raza Jersey maduraron 29 ovocitos Jersey evaluados bajo EC, que representa un 72.5% de la maduración *in vitro*. Para los mismos ovocitos evaluados bajo CP se observó un porcentaje de maduración de 67.5% con 27 ovocitos maduros, como se puede observar en la Tabla 6 y los Gráficos 10 y 11.



### **6.3. Efectividad de los dos medios de maduración, analizados por expansión de cummulus ophorus y aparición del primer corpúsculo polar**

Los medios de maduración también son parámetros a evaluar para determinar la efectividad en MIV de ovocitos bovinos. La misma muestra de 80 ovocitos inmaduros, sometida a MIV en el medio TCM-199 + SFB (Medio I) y en el medio TCM-199 +EGF (MedioII) muestra resultados sobre como se comportan cada uno frente a la maduración ovocitaria. El medio Medio I evaluado bajo EC alcanzó un 62.5%, el mismo medio bajo CP alcanzó un 72.2% de ovocitos MIV. Mientras que, en el medio II evaluado bajo EC y CP los ovocitos alcanzaron un 75% de maduración en ambos casos (Tabla 7 y Gráfico 12).

### **6.4. Análisis de varianza ANOVA.**

#### **6.4.1. Análisis de Varianza ANOVA para EC**

En el ANOVA realizado en base a la Tabla 8, se evaluó si los resultados fueron significativos para razas, medios y la combinación en entre razas y medios. Se encontró que, para estas variables evaluando la maduración ovocitaria con EC no son significativos para razas, medios y la combinación en entre razas y medios ya que las F Calculadas (FC) son menores que las F Tabulares (FT) (Tabla 9). Lo que fue comprobado con la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) que es mayor que el Error estándar de las medias (Sy), esto sumado a la desviación estándar de la

Diferencia de promedios (Dm), que nos indican que lo dicho en el ANOVA es correcto (Tabla 10). Por otro lado, el Coeficiente de Variación (CV) es de 25.61% un valor que es alto para este tipo de experimento.

#### **6.4.2. Análisis de varianza ANOVA para CP**

En este análisis de varianza realizado en base a la Tabla 11, se evaluó también si las variantes razas, medios y la combinación en entre razas y medios eran significativas al haber sido evaluados para CP. Al igual que para EC, no se encontraron diferencias significativas ya que las FC son menores que las FT (Tabla 12). La DMS es mayor que el Sy y entre Dm la diferencia no es significativa, lo que comprueba que lo expresado en el ANOVA es correcto y no existió error en su desarrollo. Finalmente, la CV es de 18.77% valor que continua siendo alto para este tipo de experimento (Tabla 13).

Los gráficos del 13 al 22, representan los ovocitos bovinos obtenidos en este estudio. Ovocitos de los cuales se determino la calidad de los ovocitos inmaduros destinados a MIV. A los ovocitos puestos a madurar se determinó si maduraron o no, evaluándolos bajo EC o CP, de donde se obtuvo los datos para los análisis estadísticos anteriores.

## 7. DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer intento de la aplicación de la técnica de maduración de ovocitos bovinos *in vitro* destinados a PIV en el Ecuador. Todos los ovarios bovinos empleados fueron recuperados de matadero, y se transportaron en termos de boca ancha a temperatura ambiente al laboratorio en un lapso de 2 horas, esto sin solución salina como reportan varios autores. Esto se realizó para mantener a los ovarios sin variación de sus condiciones (De los Reyes, Aguayo, del Campo & Barros, 1999; Ratto & Col., 1999; Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. INTA Balcarce). Adicionalmente, existen quienes transportan a los ovarios con hielo (De los Reyes & Col., 2006), lo cual es recomendado realizar únicamente cuando el tiempo de transporte de los ovarios sobrepasa el lapso de 2 horas. Por tanto, bajo las condiciones de transporte dadas en este trabajo, se considera que al provocar la menor variación en temperatura o de las condiciones fisiológicas de los ovarios, se logran recuperar ovocitos de buena calidad para su posterior MIV.

En cuanto a la metodología, con el uso de un equipo de aspiración, adaptado a tubos Falcom® y un equipo de infusión pericraneal con aguja 21G para realizar la aspiración de los folículos antrales, se pudo reducir el tiempo de aspiración, y aumentar la cantidad de ovocitos con menor daño físico, para esto se trabajó a una presión constante. Por otro lado, hay quienes consideran que la tasa de recuperación de COCs depende de la destreza del operador (Gordon , 2003).

Un aspecto de gran importancia de este experimento y sus repeticiones es que se llevaron a cabo con un grado y medio menos de temperatura (37°C) en la etapa de

maduración, frente a los 38.5°C del experimento de Fukui y Ono (1989) y que otros autores recomiendan y alcanzan resultados similares a los presentados en este estudio, es decir un 60-80% de MIV de ovocitos bovinos (Kauffold & Col., 2005; Smetanina, Tatarinova, & Krivokharchenko, 2006; Marei, Wathes, & Fouladi, 2009). Se puede decir que la MIV de ovocitos bovinos se puede llevar a cabo también a una temperatura de 37°C. Por otro lado, se trabajó sin una platina térmica en el estereomicroscopio, que contribuye para evitar shock térmico al evaluar a los ovocitos, y sin embargo, se logró cumplir con los objetivos.

En la actualidad, el interés reside en incrementar la eficacia del medio TCM-199, por tanto se usan suplementos séricos como hormonales. El SFB ha sido estudiado como principal fuente de proteínas en el medio de cultivo por varios autores (Gordon, 2003). Con el EGF se ha demostrado que su rol en la cinética de la maduración nuclear y citoplásmica son esenciales para el desarrollo de la competencia de ovocitos bovinos e incrementa significativamente el porcentaje de maduración de los éstos, así como, una subsecuente optimización de la producción de embriones (Gordon, 2003; Jamnongjit & Hammes, 2005). Adicionalmente, el EGF tiene una acción estimulante sobre las células de *cumulus* ya que en condiciones in vivo forma parte del líquido folicular presente en el folículo (Gordon, 2003). Sin embargo, el efecto de estos suplementos no es significativamente superior el uno del otro, en base a los resultados de este estudio, en donde se demuestra, que en las concentraciones usadas el EGF no funciona como un sustituto del SFB.

En los análisis de maduración *in vitro*, se alcanzó un 68.75% de maduración para EC y un 73.75% para CP, demostrando así una diferencia de 5% entre estos dos métodos de comprobación de maduración ovocitaria tras 22-24 horas de maduración. A pesar de no ser una diferencia muy marcada, CP representa un buen indicador de la MIV de ovocitos bovinos.

Por otro lado, en la Tabla 7, la maduración ovocitaria alcanzó, 62.5% con MI evaluado para EC, un 72.5% con MI evaluado para CP y 75% para MII evaluando EC y CP para ambos casos. Varios autores en estudios afines presentan porcentajes similares evaluando los mismos parámetros de MIV en este estudio, EC y CP (Totey & Col, 1992; Agung & Col., 2006; Cetica, Pintos, & Beconi, 2003).

De acuerdo a los objetivos de este estudio, parece existir una diferencia entre suplementar al medio con SFB o con EGF y entre las dos razas bovinas. Pero los análisis de varianza muestran que no existe una diferencia significativa ni entre medios, ni entre razas, ni con la combinación de razas y medios; así como, entre EC y CP, ya que, para cada uno de estos casos las FT son mayores que las FC en ambos análisis de varianza realizados.

Por otro lado, un CV de 25.61% para EC y un CV de 18.77% para CP, son valores altos para este tipo de experimento, en donde se esperaría que estos sean de 5-8%, lo cual no quiere decir que el experimento presente resultados no esperados, sino que más bien, puede existir un efecto genético de las razas evaluadas. Por tanto, existe una ligera diferencia en la tasa de maduración entre Holstein Friesian y Jersey, a pesar de que ambas son razas lecheras. Para corroborar aun más los análisis de varianza, tenemos que

las DMS con respecto a las Dm para EC y CP nos indican que no existen diferencias significativas.

Este trabajo constituye el primer reporte de la técnica de MIV de ovocitos bovinos en el Ecuador, brindando así una nueva opción a ser implementada para la mejora genética del ganado bovino del país y la región.

## **8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **8.1. CONCLUSIONES**

La técnica de MIV de ovocitos bovinos recuperados de matadero es una nueva posibilidad para mejorar los programas de reproducción asistida en bovinos e incluso la de otros mamíferos en el país.

En la aspiración de los COCs, haber usado un sistema de aspiración, permite obtener COCs de mejor calidad y en menor tiempo, pues se trabaja bajo presión constante.

El mantener a los ovocitos con el líquido folicular hasta ser evaluados, mantiene a los COCs en perfectas condiciones, ya que se considera como el medio más estable para el ovocito.

La MIV de ovocitos bovinos, puede ser llevada a cabo a 37°C de temperatura con 5% de CO<sub>2</sub>, humedad a saturación por un periodo de 22-24 horas.

El usar o no SFB con respecto a EGF dados los resultados de este proyecto debe ser evaluado más por costos que por efectividad, teniendo en cuenta que las diferencias encontradas no son significativas.

La gentamicina fue efectiva para controlar el crecimiento de cualquier patógeno presente en los ovarios y fue eficiente al ser usada en el medio de maduración ya que no existió contaminación en el medio ni tampoco afecto a la MIV de los ovocitos.

La efectividad de la técnica de MIV, ha sido comprobada y es una solución para optimizar los procesos de mejora genética bovina en el Ecuador.

## **8.2. RECOMENDACIONES**

Se deben evaluar diferentes concentraciones de SFB y EGF y así determinar si existe alguna que sea más óptima para la MIV de ovocitos bovinos y así mejorar las tasas de ovocitos madurados después del tratamiento.

Se debe evaluar el efecto otros suplementos como la cisteamina, el IGF-I (*Insuline like Growth Factor*), la glucosa, entre otros que reportan la literatura.

Por otro lado, se debe evaluar la técnica de MIV ovocitara con más razas (cruces) lecheras y así establecer diferencias, así como también, evaluar razas lecheras vs. carne (Cebú) y determinar la predominancia del factor genético sobre la MIV de ovocitos bovinos.

El método descrito en este proyecto funciona perfectamente con vacas destinadas a matadero, pero generalmente las vacas de interés se encuentran en su mejor momento de producción lechera, por tanto, es importante considerar técnicas como la OPU (*Ovum Pick Up*) y la TAO (*Transillumination-aspiration ovary*) (Gordon , 2003), que permiten recuperar ovocitos de donantes vivas.

A un futuro próximo se debe considerar la constitución de bancos de germoplasma bovinos, para que en la medida que se hace una intervención genética a gran escala en los bovinos, podamos conservar la diversidad genética que contamos en la actualidad.



Las investigaciones consiguientes deben enfocarse en desarrollar métodos que permitan obtener la mayor cantidad de ovocitos viables tras haber sido sometidos a procesos de criopreservación o vitrificación.

Finalmente, es necesario continuar con estudios de ovocitos MIV destinados a PIV de embriones, para así poder establecer los parámetros para que esta actividad pueda ser desarrollada a gran escala, a nivel comercial y llegar a ser un país exportador de embriones.

## 9. BIBLIOGRAFIA

### Trabajos citados

- Agung, B., & Col. (2006). Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of in vitro fertilized bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 52: 123-127.
- Ahuja, C., & Col., &. (2009). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Trop.*, 27(3): 277-284.
- Al-Amin, M., Nahar, A., & Ali, M. (2007). Luteinizing Hormone (LH) effects on in vitro nuclear maturation of bovine oocytes. *Asian Journal of Cell Biology*, 50-53.
- Alberio, R. (2003). Nuevas biotecnologías reproductivas. Aspectos biológicos y económicos. *Dpto. Prod. Anim. INTA Balcarce*.
- Alberio, R. (Enero 2011). Comunicación personal.
- Aller, F. (2004). Aplicación de la producción in vitro de embriones en producción animal. *INTA expone 2004 en la pampa húmeda* (págs. 1-4). Rivadavia: INTA.
- Álvarez, J. (2007). Historia contemporánea: las técnicas complejas de reproducción asistida. *Ginecología y Obstetricia de México*, 293-302.
- Anchamparuthy, V., & Col. (2009). Vitrification of bovine oocytes: implications of follicular size and sire on the rates of embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*, 26: 613-619.

- Barrett, S., & Albertini, D. (2010). Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning and enhances developmental competence. *Journal of Assisted Reproduction Genetic*, 27: 29-39.
- Bavister, B. (2002). Early history of in vitro fertilization. *Reproduction*, 181–196.
- Blerkom, J., Bell, H., & Weipz, D. (1990). Cellular Developmental Biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization, and preimplantation embryogenesis in vitro. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 16: 298-323.
- Celestinos, M., & Gatica, R. (2002). Vitricación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivo Medicina Veterinaria*, 157-165.
- Cetica, P., Pintos, L., & Beconi, M. (2003). Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*, 126: 753-763.
- Chanson, A., & Col. (2001). Development fo a well-defined medium for the in vitro maturation of immature bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of assisted reproduction and Genetics*, 18:97- 105.
- Chohan, K., & Hunter, A. (2003). Effects of reproductive status on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Journal of Veterinary Science*, 4: 67-72.
- Comte, M. (1991). *Opciones vitales*. Ceres.

- De la Fuente, J., & Col. (1996). Obtención continuada de ovocitos sobre terneras impúberes superovuladas. *IV Congreso Internacional A.N.E.M.B.E. de medicina bovina: Libro de ponencias*, 122.
- De los Reyes, M., & Col. (2006). Histological characteristics and steroid concentration of ovarian follicles at different stages of development in pregnant and non-pregnant dairy cows. *Veterinary Research Communications*, 30:161-173.
- De los Reyes, M., Aguayo, J., del Campo, H., & Barros, C. (1999). Evaluación de ovocitos de vaca para maduración en cultivo. *Avances en ciencias veterinarias*, 14: .
- Domínguez, J. (2007). La reproducción del ganado vacuno y la sociedad moderna. *8ª jornadas internacionales de reproducción animal* (págs. 4-18). Santande, España: Upjohn.
- Fernández, A., Bastidas, P., & Trocóniz, J. (1997). Fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas Cebu postmortem. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*
- Fernández, A., Bastidas, P., & Trocóniz, J. (1997). Fertilización in vitro de ovocitos recolectados de vacas Cebu postmortem. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*
- Fernandez, F., Hernandez, E., & Reyes, M. (2010). Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Revista de Salud Animal*, 78-83.
- Figueirêdo, V., & Magalhães, L. (2010). In vitro embryo production in small ruminants. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 409-413.

- Gandhi, A., & Col. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human reproduction*, 395-401.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cambridge: CABI Publishing.
- Hashimoto, S. (2009). Application on in vitro maturation to assisted reproductive technology. *Journal of Reproduction and Development*, 1-10.
- Hernández, A., Navaja, H., & Vélchez, V. (2010). Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos bovinos para maduración in vitro. *Producción Animal*, 41-44.
- Herradón, P., & Col. (2007). Fecundación in vitro: Alternativa para la mejora genética en bovinos. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*, 34-41.
- Jamnongjit, M., & Hammes, S. (2005). Oocyte Maturation: The Coming of Age of a Germ Cell. *Seminars in Reproductive Medicine*, 23:234-241.
- Kauffold, J., & Col. (2005). The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *Journal of Reproduction and Development*, 51: 325-332.
- Kerkdijk, H. (28 de Febrero de 2010). *El Proyecto Taurus: Resucitando a un Bovino Extinto*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2010, de Perulactea: <http://www.perulactea.com/2010/02/28/el-proyecto-taurus-resucitando-a-un-bovino-extinto/>
- Koeslag, J., & Col. (2008). *Manuales para educación agropecuaria: Bovinos de leche*. Área: *Producción animal*. México: Trillas, 3ra edición.

- Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. INTA Balcarce. (s.f.). Metodología para la obtención y maduración de ovocitos in vitro. En *Protocolo de producción in vitro de embriones bovinos*.
- Machatkova, M., & Col. (2006). Collection of oocytes from donors in the growth phase of follicular development can enhance the production of bovine embryos for cryopreservation. *Veterinari Medicina*.
- Marei, W., Wathes, C., & Fouladi, A. (2009). The effect of linoleic acid on bovine oocyte maturation and development. *Biology of Reproduction*, 81: 1064-1072.
- Martínez, A., & Valcárcel, A. (2008). Vitrificación de embriones bovinos obtenidos in vitro. *Reproducción*, 23:21-33.
- Mattiello, S. (1998). El proceso de domesticación. *Obiettivi y Documenti Veterinari*.
- Memili, E., & Col. (2007). Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction*, 133: 1107-1120.
- Mucci, N., & Col. (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivo Medico Veterinario*.
- Ocaña, J., & Col. (1997). Efecto del medio de cultivo y la suplementación protéica en la maduración in vitro de ovocitos bovinos. *Archivos de zootecnia*.
- Ocaña, J., & Col. (1998). Influence of human and bovine insulin on in vitro maturation, fertilization and cleavage rates of bovine oocytes. *Archivos de zootecnia*, 85-93.

- Ocaña, J., & Col. (1999). The effect of different sera and bovine serum albumen fraction (BSA) on in vitro maturation of immature bovine oocytes. *Archivos de zootecnia vol. 48, num.182*, 174.
- Palma, G., & Brem, G. (1993). *Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina*. Buenos Aires: Editorial Hemisferio sur.
- Ratto, M., & Col. (1999). Desarrollo de embriones de bovino obtenidos por fecundación in vitro cultivados con células oviductuales o medio condicionado y transferencia a hembras receptoras. *Archivos de medicina veterinaria*, 31:89-96.
- Rizos, D., & Col. (2002). Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development In vitro vs. In Vivo: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61: 234-248.
- Rodríguez-Martínez, H. (2008). La eficiencia reproductiva en vacas lecheras de alta producción: ¿Es sostenible con las prácticas de manejo actuales? *I.V.I.S (Ed.), IVIS Reviews in Veterinary Medicine*.
- Ruiz, J., & Correa, J. (2007). Desarrollo partenogénico in vitro con ovocitos vitrificados bovinos. *Sitio Argentino de producción animal*.
- Sagirkaya, H., & Col. (2004). Replacement of fetal calf serum with synthetic serum substitute in the in vitro maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Turkey Journal of Veterinary and Animal Science*, 28: 779-784.

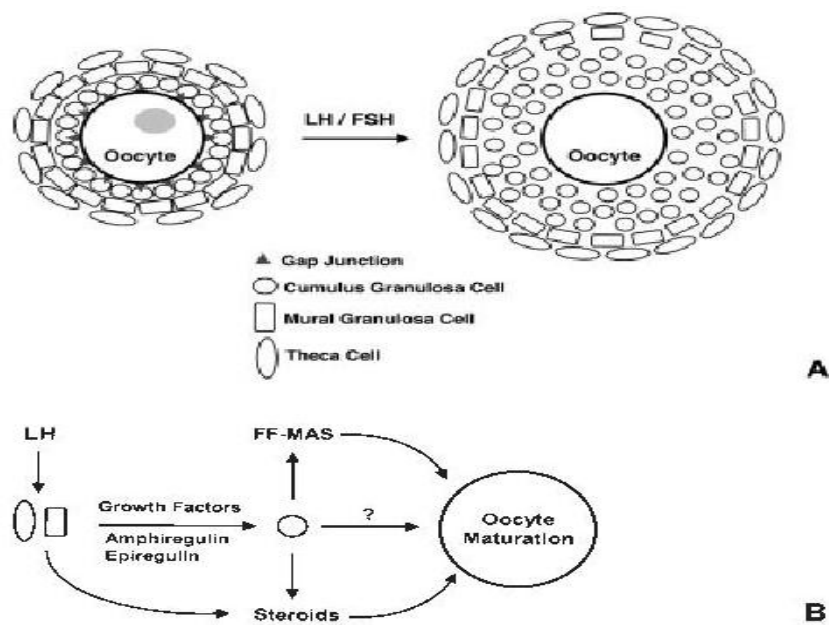
- Samardzija, M., & Col. (2006). Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*.
- Segura, J., & Montes, R. (2001). Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Revista Biomedica*, 196-206.
- Serrano, C., & Col. (2002). Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos in vitro. *Revista Colombiana de Ciencia Pecuaria*, 286-292.
- Shirazi, A., & Col. (2010). Effects of Growth Hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. *Reproduction in domestic animals*, 530-536.
- Smetanina, I., Tatarinova, L., & Krivokharchenko, A. (2006). In vitro Fertilization of Bovine Oocytes in Protein- Free Culture Sistem. *Russian Journal of Developmental Biology*, 37: 438-443.
- Sogorescu, E., & Col. (2010). The influence of new media on the developmental. *Romanian Biotechnological Letters*, 19-25.
- Spiropoulos, J., & Long, S. (1991). A comparison of the effects of the estrus cow serum and fetal calf serum on in vitro nuclear maturation of bovine oocytes. *Getecis Selection evolution*, 101-205.
- Tamassia, M., & Col. (2003). Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development in vitro. *Reproduction*, 126: 629-637.



- Tarasco, M. (1996). PONENCIAS: Bioetica y fecundacion in vitro. *Revista de derecho puertorriqueño*.
- Totey, S., & Col. (1992). In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Reproduction & Fertility*, 597-607.
- Wang, Z., Xu, Z., & Yu, S. (2007). Effects of oocyte collection techniques and maturation media on in vitro maturation and subsequent embryo development in Boer goat . *Czech Journal of Animal Science* , 21-25.
- Yul, K., & Cheng, R. (1998). Maturatuion in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction* , 103-120.

## 10.GRÁFICOS

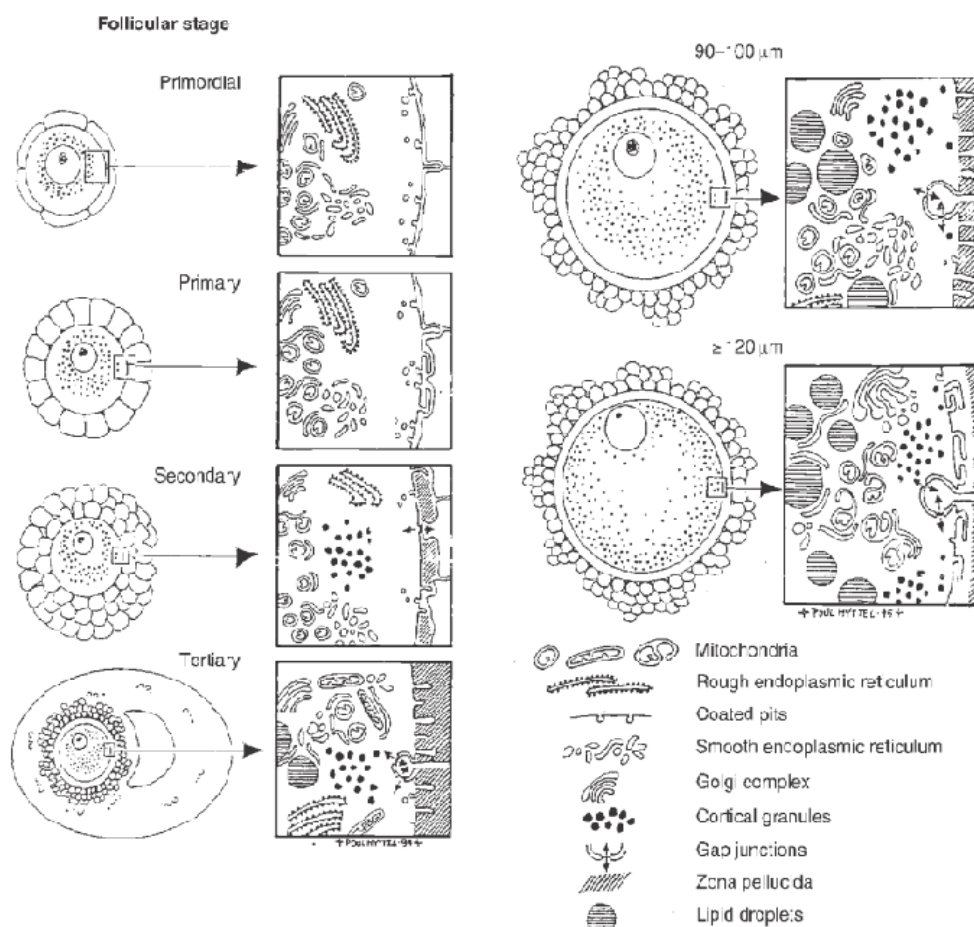
**Gráfico 1. Cambios estructurales en la maduración ovocitaria**



- A. Esquema de la estructura folicular y gonadotropinas mediante la expansión del cumulus. B. cascada de reacción de maduración inducida por gonadotropinas

**Fuente:** (Jamnongjit & Hammes, 2005)

**Gráfico 2. Cambios ultraestructurales del ovocito durante el crecimiento folicular**



Esquema paso a paso de la maduración de ovocitos, los orgánulos citoplasmáticos se ubican próximos a la membrana una vez retomada la maduración. Esto ocurre tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

**Fuente:** (Gordon , 2003)

### Gráfico 3. Acondicionamiento y limpieza de ovarios de vacas Holstein Friesian



Remoción de los restos de trompas de Falopio y oviducto presente en los ovarios recuperados de matadero.

### Gráfico 4. Limpieza de restos de oviducto y trompas de Falopio de ovarios de vacas Holstein Friesian



Remoción de los restos de trompas de Falopio y oviducto presente en los ovarios recuperados de matadero.

**Gráfico 5. Equipo de aspiración folicular adaptado para este proyecto**



Tubo Falcom<sup>®</sup> adaptados a una bomba de vacío mediante un equipo de infusión pericránea con aguja 21G.

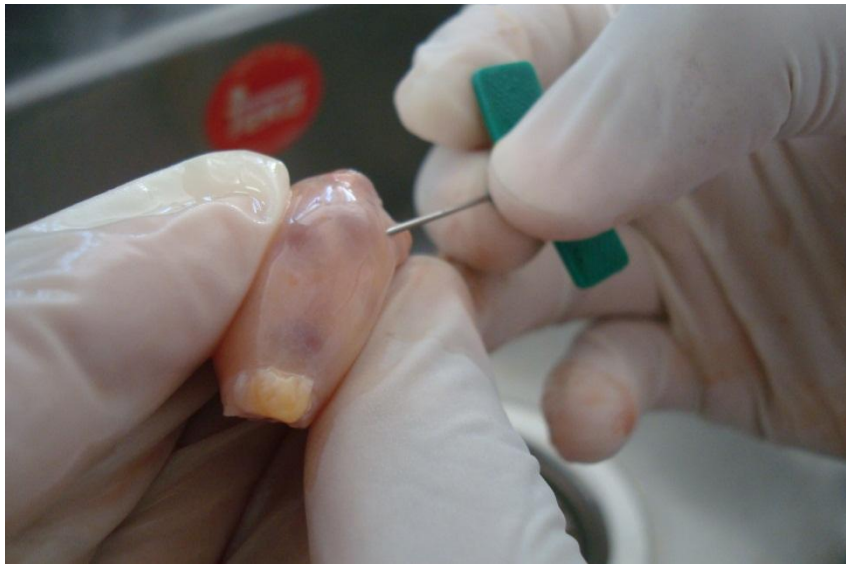
**Gráfico 6. Ovarios previos a la aspiración folicular**



Ovarios conservados en solución fisiológica al 9% y 5% de gentamicina a temperatura ambiente, hasta el momento de la aspiración.



**Gráfico 7. Folículo antral previo a ser aspirado**



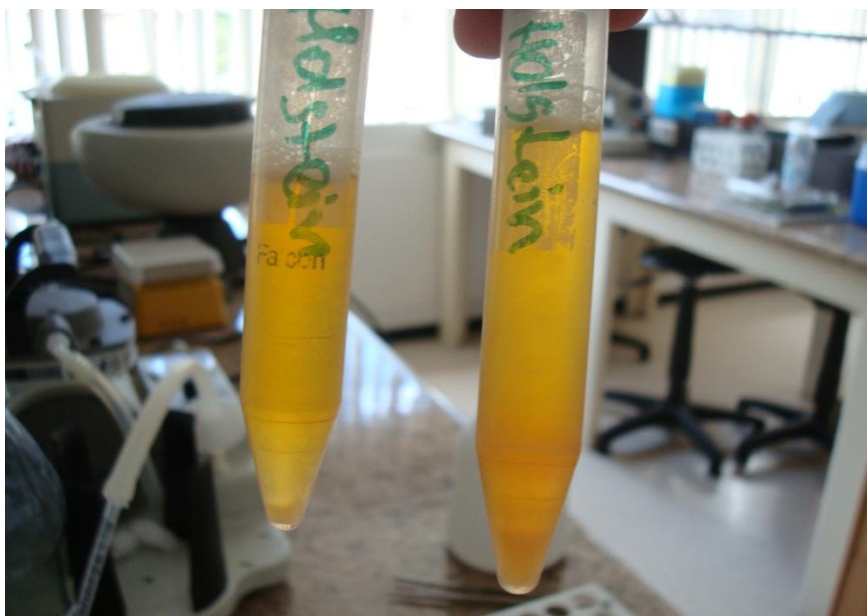
Ovario con folículo antral seleccionado a ser aspirado, adicionalmente se observa la técnica de aspiración folicular.

**Gráfico 8. Folículo antral después de la aspiración**



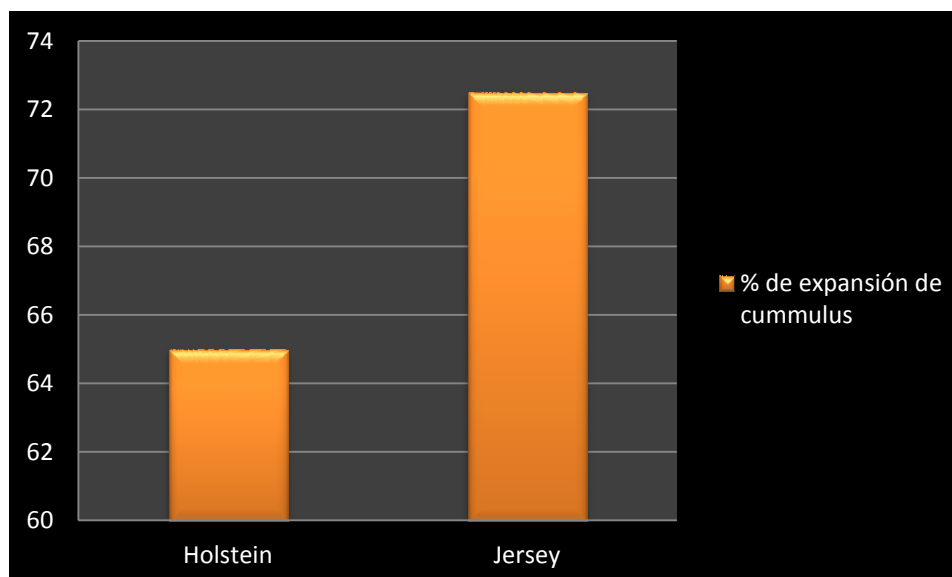
Ovario con folículo antral después de ser aspirado, adicionalmente se observa la técnica de aspiración folicular.

**Gráfico 9. Líquido folicular recuperado de los folículos antrales, mantenidos en tubos Falcom®.**



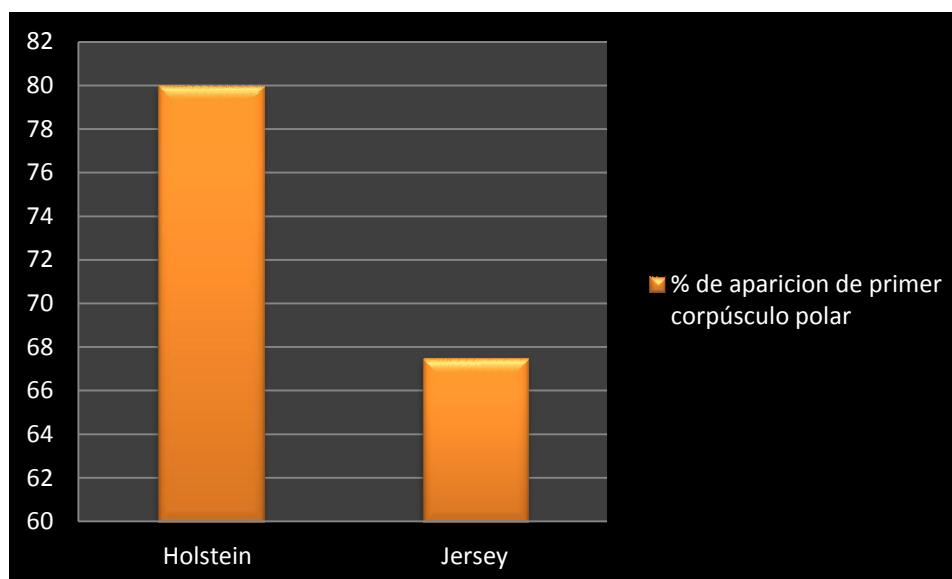
Líquido folicular proveniente de ovarios de vacas Holstein Friesian recuperado en Tubos Falcom® que contiene a los complejos *cummulus* –ovocitos.

**Gráfico 10. Tasa de expansión de cummulus en ovocitos MIV**



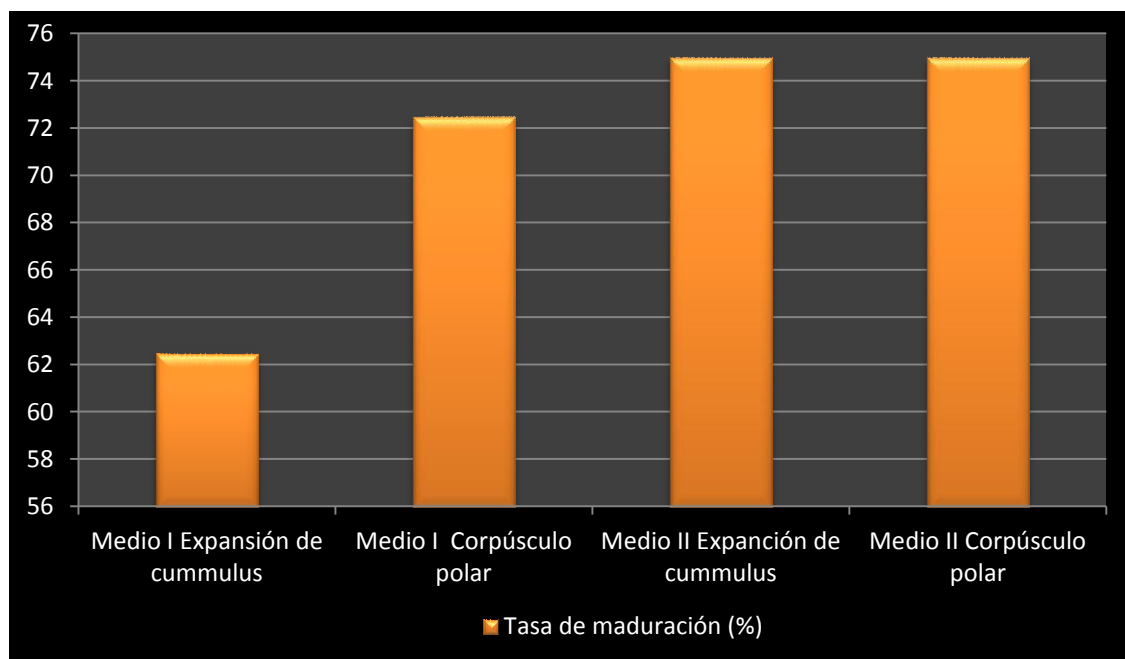
Datos de ovocitos MIV obtenidos luego de 4 repeticiones evaluando EC. Para la raza Holstein Friesian se alcanzó un 65% y para Jersey un 72.5% de MIV.

**Gráfico 11. Tasa de aparición de primer corpúsculo polar en ovocitos MIV**



Datos de ovocitos MIV obtenidos luego de 4 repeticiones evaluando CP. Para la raza Holstein se alcanzó un 80% y para Jersey un 67.5% de la MIV.

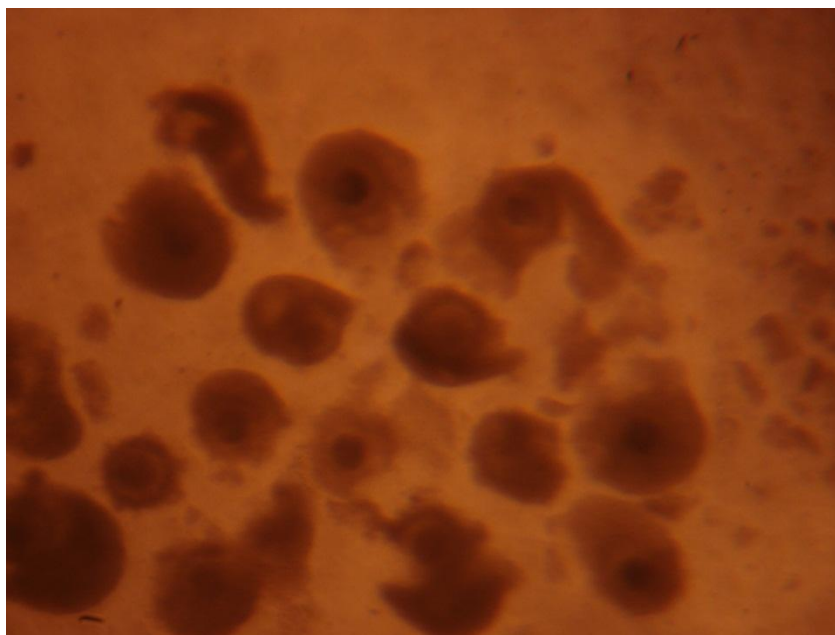
**Gráfico 12. Tasa de maduración según parámetro observado: Medio + EC o CP**



Medio I= TCM-199 + SFB; Medio II= TCM-199 +EGF. Luego de 22-24horas de MIV y cuatro repeticiones aleatorias. Medio I por EC 62.5%, Medio II por EC 75%, Medio I por CP 72.5% y Medio II por CP 75%.



**Gráfico 13. Ovocitos inmaduros primera repetición de raza Holstein.**



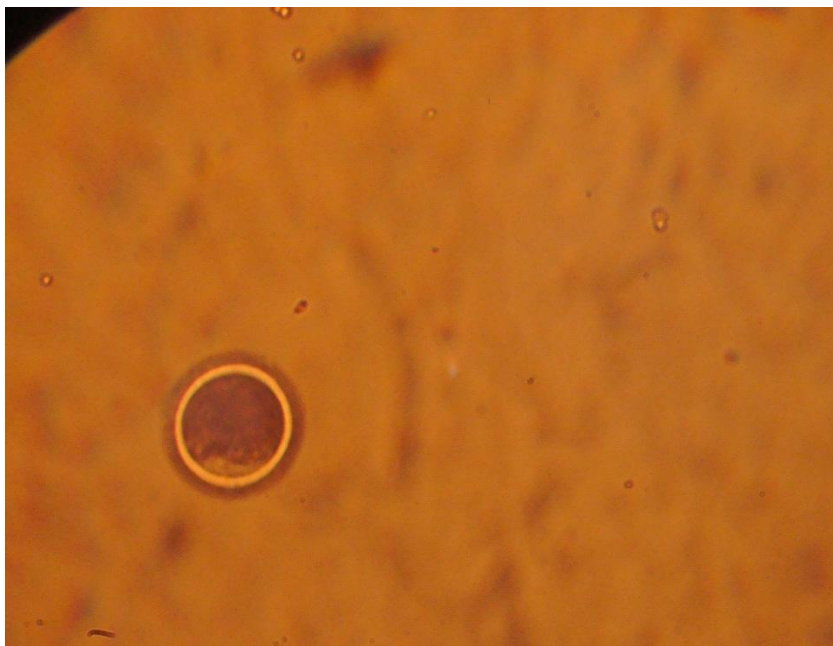
Ovocitos inmaduros de raza Holstein, evaluados para determinar su calidad para su uso en los experimentos de este estudio.

**Gráfico 14. Ovocitos Maduros de raza Jersey evaluado por CP de la primera repetición**



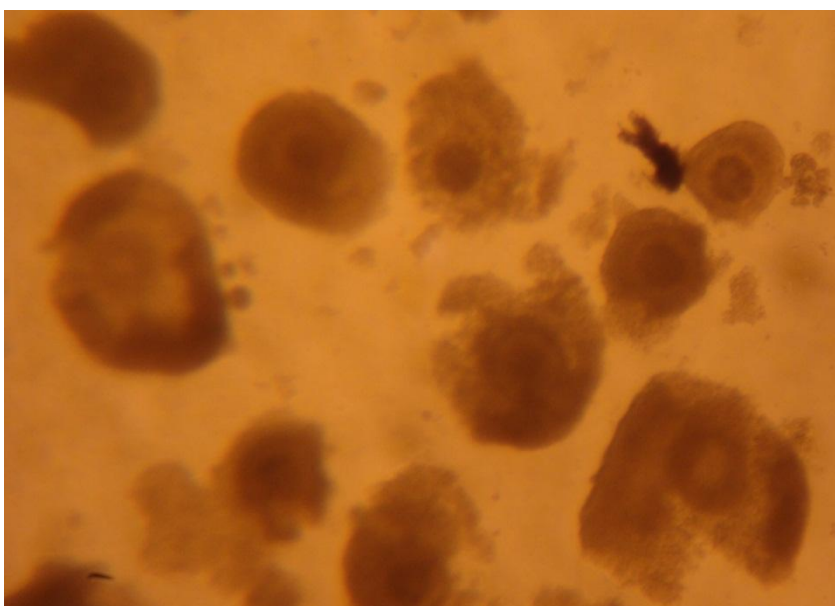
Ovocitos que han alcanzado la MIV luego de 22-24 horas de maduración con el medio TCM-199 + SFB.

**Gráfico 15. Ovocito Maduro de Raza Holstein evaluado por CP con medio TCM-199 + EGF de la primera repetición**



Ovocitos que han alcanzado la MIV luego de 22-24 horas de maduración con el medio TCM-199 +EGF.

**Gráfico 16. Ovocitos inmaduros segunda repetición de raza Jersey**



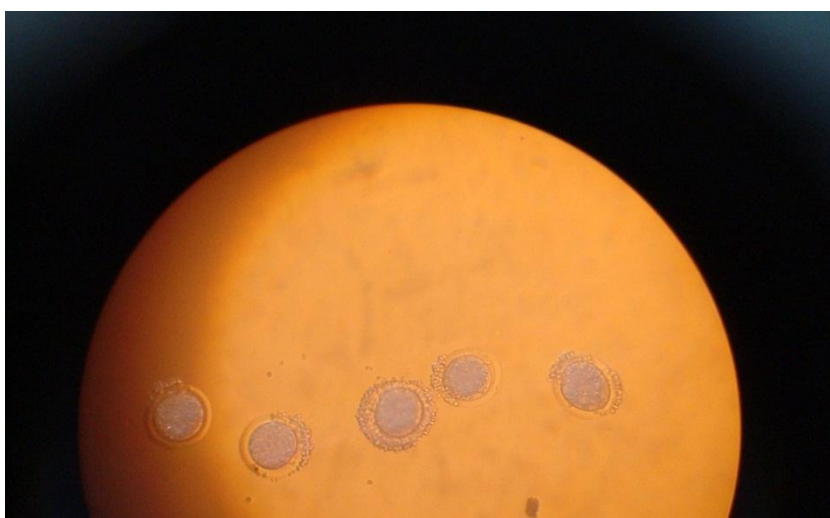
Ovocitos inmaduros, evaluados para determinar su calidad para su uso en los experimentos de este estudio.

**Gráfico 17. Ovocito maduro de raza Jersey evaluado bajo EC de la segunda repetición con TCM-199 + EGF**



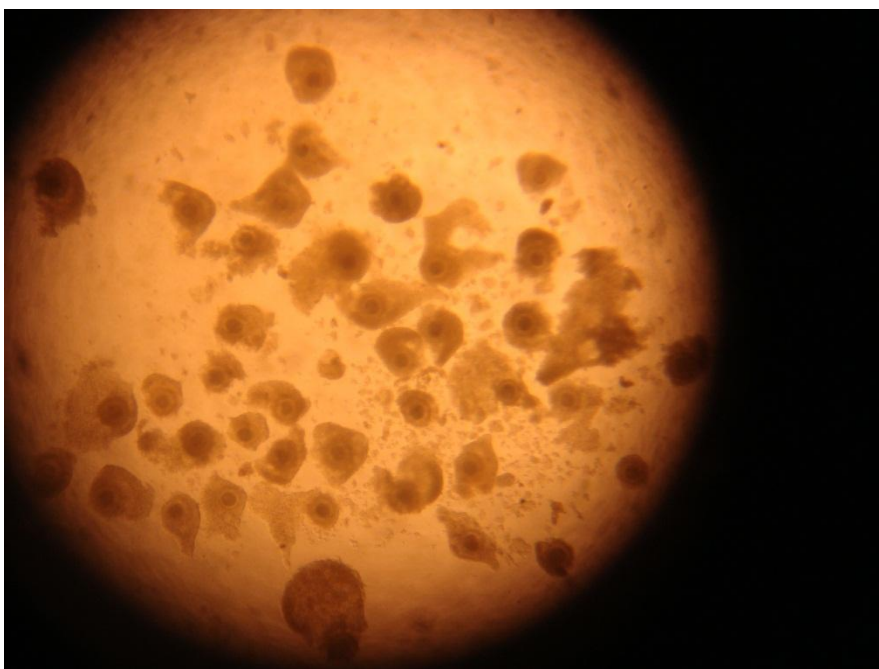
Ovocito MIV con la presencia de células de *cummulus ophorus* expandidos, siendo la expansión un indicador positivo de la maduración.

**Gráfico 18. Ovocitos maduros de Raza Holstein evaluados por CP con medio TCM-199 +SFB**



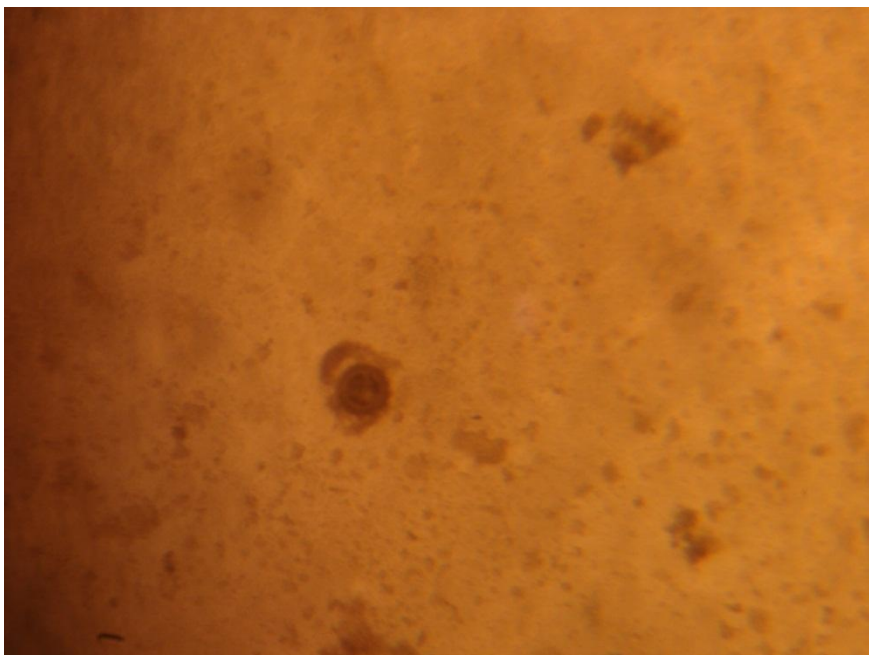
Ovocitos que han alcanzado la MIV luego de 22-24 horas de maduración con el medio TCM-199 + EGF. Se observa la aparición del primer corúsculo polar.

**Gráfico 19. Ovocitos inmaduros tratamientos 3 y 4 raza Holstein**



Ovocitos inmaduros, evaluados para determinar su calidad para su uso en los experimentos de este estudio..

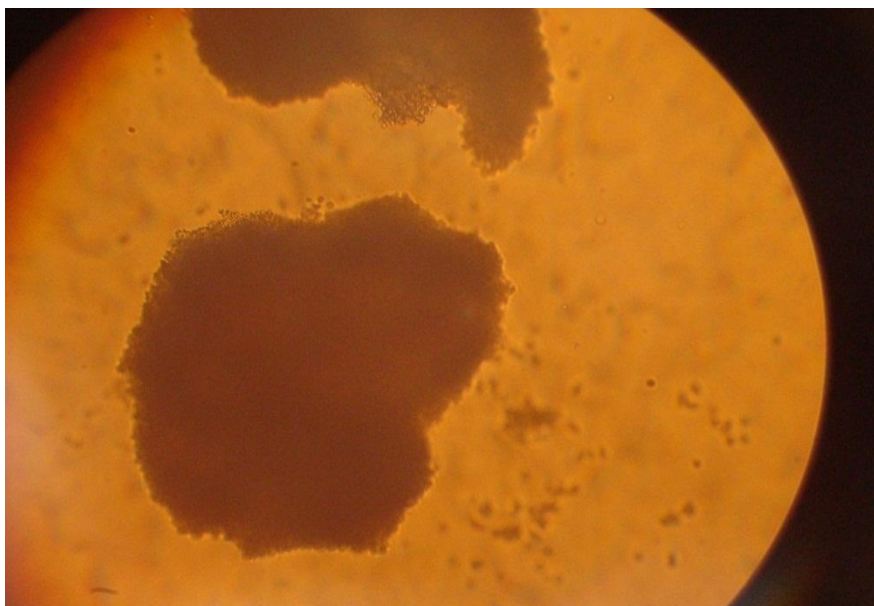
**Gráfico 20. Ejemplo de Ovocito inmaduro de baja calidad, no tomado en cuenta para el estudio**



Ovocito sin la presencia de células del *cummulus ophorus*, considerado como ovocito de baja calidad, para ser sometido al proceso de MIV.

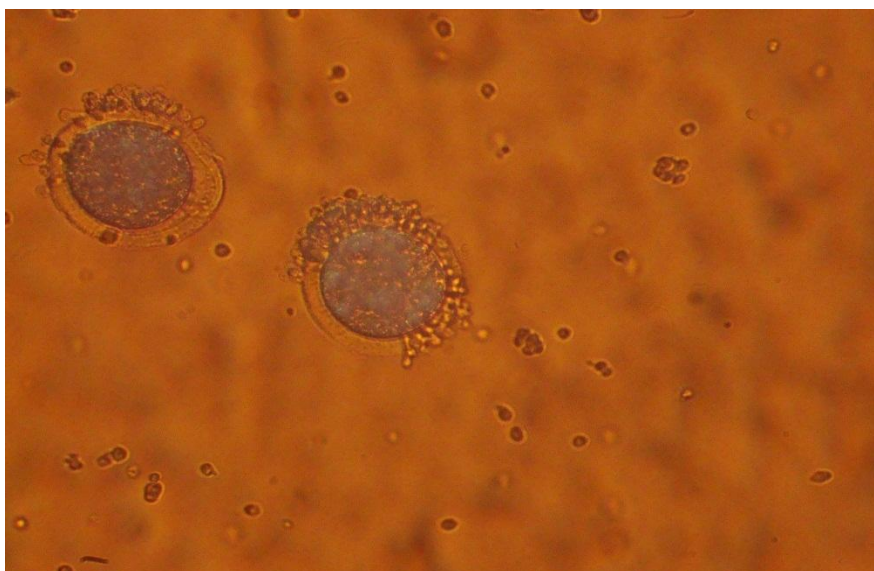


**Gráfico 21. Expansión de Cummulus de ovocitos madurados de raza Holstein con TCM-199 + SFB**



Ovocito MIV con la presencia de células de *cummulus ophorus* expandidos, siendo la expansión un indicador positivo de la maduración.

**Gráfico 22. CP de ovocito maduro con TCM-199 + EGF cuarta repetición de raza Jersey**



Ovocitos que han alcanzado la MIV luego de 22-24 horas de maduración con el medio TCM-199 + EGF. Se observa la aparición del primer corúsculo polar.

## 11.TABLAS

**Tabla 1. Hitos en la transferencia de embriones de animales de granja y técnicas relacionadas**

<b>Año</b>	<b>Evento</b>	<b>Investigador(es)</b>
<b>1951</b>	Conocimiento de la capacitación espermática	Austin; Chang
<b>1959</b>	Fertilización <i>in vitro</i> en conejos	Chang
<b>1963</b>	FIV con esperma capacitado <i>in vitro</i>	Yanagimachi y Chang
<b>1969</b>	Fertilización de óvulos humanos <i>in vitro</i>	Beavister <i>et al.</i> ; Edwards <i>et al.</i>
<b>1977</b>	Fertilización de óvulos bovinos <i>in vitro</i>	Iritani y Niwa
<b>1978</b>	Primer nacimiento humano de un embrión resultado de FIV	Steptoe y Edwards
<b>1982</b>	Primer ternero nacido de FIV en ganado	Brackett <i>et al.</i>
<b>1986</b>	Clonación en ovejas por transferencia nuclear	Willadsen
<b>1986</b>	Terneros nacidos tras FIV luego de maduración <i>in vitro</i>	Hanada <i>et al.</i>
<b>1988</b>	Producción de gemelos en ganado después de transferencia de embriones resultado de PIV	Lu <i>et al.</i>

Traducido y Adaptado de Laboratory Production of Cattle Embryos de Gordon, 2003.

**Tabla 2. Hitos en FIV de mamíferos**

<b>Año</b>	<b>Especie</b>	<b>Evento</b>	<b>Investigador(es)</b>
<b>1890</b>	Conejo	Nacimiento de crías como el resultado de transferencia de embriones(TE)	Heape
<b>1940</b>	Ovinos/ Caprinos	Nacimiento de un cordero y un chivo resultado de TE	Warwick y Berry
<b>1951</b>	Cerdo	Nacimiento de Lechones resultado de TE	Kvansnickii
<b>1951</b>	Bovinos	Nacimiento de un ternero resultado de TE	Willett <i>et al.</i>
<b>1971</b>	Bovinos	Formación de primera compañía de TE bovina	Alberta Livestock
<b>1973</b>	Bovinos	Nacimiento de terneros después de la etapa de congelamiento (Frosty II)	Wilmult y Rowson
<b>1974</b>	Caballos	Nacimiento de un pony como resultado de TE	Oguri y Tsutsumi
<b>1982</b>	Bovinos	Nacimiento de un ternero después de FIV	Brackett <i>et al.</i>
<b>1983</b>	Búfalo	Nacimiento de un ternero luego de TE	Drost <i>et al.</i>
<b>1986</b>	Ovinos	Nacimiento de cordero vía transferencia nuclear (Clonación)	Willadsen
<b>1988</b>	Bovinos	Obtención de gemelos bovinos a través de PIV TE	Lu <i>et al.</i>
<b>1997</b>	Ovinos	Nacimiento de un cordero clonado de una célula adulta	Wilmult <i>et al.</i>

Traducido y Adaptado de Laboratory Production of Cattle Embryos de Gordon, 2003.

**Tabla 3. Parámetros de selección de ovocitos destinados a ser madurados *in vitro***

<b>Categoría</b>	<b>Descripción del parámetro</b>
<b>I</b>	Cumulus completo, más de tres capas, y compacto
<b>II</b>	Cumulus parcial, rodeando completamente al ovocito o < de 3 capas y compacto
<b>III</b>	Cumulus expandido, el cumulus aparece amontonado en diferentes lugares
<b>IV</b>	Ovocito sin cumulus, rodeado únicamente por ZP

**Adaptado de:** (Domínguez, 2007; Tamassia & Col., 2003)

**Tabla 4. Orden aleatorio de los tratamientos en sus cuatro repeticiones**

I	II	III	IV
1	2	3	4
2	3	2	3
3	1	4	2
4	4	1	1

1: Holstein + TCM-199 con SFB; 2: Holstein + TCM-199 con EGF; 3: Jersey + TCM-199 con SFB; 4: Jersey + TCM-199 con EGF. I-IV: Repeticiones

**Tabla 5. Resultados de maduración ovocitaria, por repetición, raza, y medio usado**

		Ovocitos puestos a madurar		Ovocitos Maduros Cummulus expansión		Ovocitos Maduros corpúsculo polar	
Repeticiones	Razas	Medio I	Medio II	Medio I	Medio II	Medio I	Medio II
I	H	5	5	4	3	4	4
I	J	5	5	4	4	3	3
II	H	5	5	1	4	4	5
II	J	5	5	4	4	3	3
III	H	5	5	4	4	5	3
III	J	5	5	3	4	4	4
IV	H	5	5	2	4	3	4
IV	J	5	5	3	3	3	4
	(n)	40	40	25	30	29	30
<b>TOTAL</b>				<b>55</b>		<b>59</b>	
<b>%</b>				<b>68.75</b>		<b>73.75</b>	

Todos los datos obtenidos de 4 repeticiones, 22-24 horas de MIV, con todas las variantes experimentales: Ovocitos (inmaduros y maduros), H= Holstein; J = Jersey; Medio I = TCM-199 + SFB; Medio II = TCM-199+EGF.

**Tabla 6. Tasa de maduración ovocitaria por raza**

Expansión de cummulus ophorus		
Razas	Ovocitos puestos a madurar	Ovocitos madurados (%)
Holstein	40	26 (65)
Jersey	40	29 (72.5)
Aparición del primer corpúsculo polar		
Razas	Ovocitos puestos a madurar	Ovocitos madurados
Holstein	40	32 (80)
Jersey	40	27 (67.5)



**Tabla 7. Tasa de maduración con respecto al medio de maduración y el parámetro evaluado.**

Medio	Evaluación	Tasa de maduración (%)
Medio I	Expansión de cummulus	62.5
Medio I	Corpúsculo polar	72.5
Medio II	Expansión de cummulus	75
Medio II	Corpúsculo polar	75

Medio I = TCM-199 + SFB; Medio II = TCM-199+EGF.

**Tabla 8. Tabla de dos entradas para Expansión de cummulus ophorus**

	I	II	III	IV	$\Sigma$	Promedio
H- Medio I	4	1	4	2	11	2.75
H- Medio II	3	4	4	4	15	3.75
J-Medio I	4	4	3	3	14	3.5
J-Medio II	4	4	4	3	15	3.75
	15	13	15	12	55	

H= Holstein Friesian; J= Jersey; Medio I = TCM-199 + SFB; Medio II = TCM-199+EGF. I-IV repeticiones.

**Tabla 9. Análisis de varianza para expansión de cummulus ophorus.**

FV	GL	SC	CM	FC	FT
<b>TOTAL</b>	15	11.9375			
<b>Tratamiento</b>	3	2.6875	0.89583333	1.16216216	3.89
<b>A</b>	1	0.5625	0.5625	0.72972973	4.75
<b>B</b>	1	1.5625	1.5625	2.02702703	4.75
<b>AxB</b>	1	0.5625	0.5625	0.72972973	4.75
<b>Error</b>	12	9.25	0.77083333		

FV= Fuente de variación; GL= Grados de Libertad; SC= suma de cuadrados; CM= Cuadrados medios; FC= F calculada; FT= F tabular; A= Medios; B= Razas; AxB= Razas vs. Medios.

**Tabla 10. Pruebas de significancia para expansión de cummulus ophorus.**

CV	Sy	Sd	DMS	Dm 3-1	Dm 2-4
25.61	0.468	0.662	0.742	0.75	0

CV= Exactitud variable del experimento; Sy= Error estándar de las medias; Sd= error estándar de la diferencia entre medias; DMS= Diferencia mínima significativa; Dm= diferencia de promedios; 3-1= Jersey – Holstein con medio I; 2-4= Holstein – Jersey con medio II; Medio I = TCM-199 + SFB; Medio II = TCM-199+EGF.

**Tabla 11. Tabla de dos entradas para corpúsculo polar**

	I	II	III	IV	$\Sigma$	Promedio
H- Medio I	4	4	5	3	16	4
H- Medio II	4	5	3	4	16	4
J-Medio I	3	3	4	3	13	3.25
J-Medio II	3	3	4	4	14	3.5
	14	15	16	14	59	

H= Holstein Friesian; J= Jersey; Medio I = TCM-199 + SFB; Medio II = TCM-199+EGF. I-IV repeticiones.

**Tabla 12. Análisis de Varianza para la aparición del primer corpúsculo polar**

FV	GL	SC	CM	FC	FT
<b>TOTAL</b>	15	7.4375			
<b>Tratamientos</b>	3	1.6875	0.5625	1.17391304	3.89
<b>A</b>	1	1.5625	1.5625	3.26086957	4.75
<b>B</b>	1	0.0625	0.0625	0.13043478	4.75
<b>AxB</b>	1	0.0625	0.0625	0.13043478	4.75
<b>Error</b>	12	5.75	0.47916667		

FV= Fuente de variación; GL= Grados de Libertad; SC= suma de cuadrados; CM= Cuadrados medios; FC= F calculada; FT= F tabular; A= Medios; B= Razas; AxB= Razas vs. Medios.

**Tabla 13. Pruebas de significancia para aparición del primer corpúsculo polar.**

CV	Sy	Sd	DMS	Dm 1-3	Dm 2-4
18.77	0.346	0.588	0.659	0.75	0.5

CV= Exactitud variable del experimento; Sy= Error estándar de las medias; Sd= error estándar de la diferencia entre medias; DMS= Diferencia mínima significativa; Dm= diferencia de promedios; 3-1= Holstein- Jersey con medio I; 2-4= Holstein – Jersey con medio II, Medio I = TCM-199 + SFB; Medio II = TCM-199+EGF.

## 12.ANEXOS

### Anexo 1. Periodos históricos de las técnicas complejas de reproducción asistida

#### Periodo preparatorio

1790	Primer nacimiento mediante inseminación homóloga (semen del esposo)
1890	Primer nacimiento con inseminación heteróloga (semen de donador)
1951	Capacitación espermática
1953	Criopreservación de semen
1960	Desarrollo del laparoscopio en ginecología
1960-1970	Protocolos de hiperestimulación ovárica
1968	Fecundación del primer óvulo humano <i>in vitro</i>
1968	Steptoe y Edwards empezaron a trabajar en equipo
1972	Sentencia Roe vs Wade
1978	Nacimiento de Louise Joy Brown, primer producto de la fecundación <i>in vitro</i> en ciclo natural (Gran Bretaña)

#### Periodo de la manipulación de gametos

1980	Uso de ultrasonido para aspiración de óvulos
1980	Nacimiento de Candice Reed, primer producto de fecundación <i>in vitro</i> en ciclo estimulado (Australia)
1981	Nacimiento de Elizabeth Jordan Carr, primer producto de la fecundación <i>in vitro</i> en América (EUA)
1983	Transferencia de ovocitos a la trompa de Falopio
1983	Nacimiento del primer producto de óvulo donado
1984	Primeros productos de fecundación <i>in vitro</i> en Latinoamérica
1984	Primer nacimiento producto de la transferencia de un embrión a una madre subrogada
1984	Nacimiento del primer producto de GIFT
1984	Primer nacimiento de un embrión donado
1984	Primer nacimiento producto de un embrión criopreservado
1986	Primer nacimiento de un óvulo criopreservado
1987	Primer nacimiento de un producto con ZIFT (zygote intrafallopian transfer)

#### Periodo de la micromanipulación de gametos

1988	Primer nacimiento con SUZI (subzonal sperm injection)
1989	Primer nacimiento con PZD (partial zonal dissection)
1992	Primer nacimiento por ICSI (intracytoplasmic sperm injection)

#### Periodo de la clonación humana

1993	Clonación embriónica
2001	Clonación humana por transferencia nuclear (sin fin reproductivo)

Fuente: (Álvarez, 2007).

## Anexo 2. Composición detallada del Medio TCM-199

**SIGMA-ALDRICH®**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA  
Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757  
email: techservice@sigma.com sigma-aldrich.com

### Product Information

#### Medium 199

Many early tissue culture media were predominantly formulated from animal products and/or tissue extracts. In 1950, Morgan and his coworkers reported their efforts to produce a totally defined nutritional source for cell cultures. Their experiments, conducted with various combinations of vitamins, amino acids, and other factors revealed that growth of explanted tissue could be measured in what has become known as Medium 199.

However, it was found that long-term cultivation of cells required addition of a serum supplement to the culture medium. When properly supplemented, Medium 199 has broad species applicability, particularly for cultivation of non-transformed cells. It is widely used in virology, vaccine production, and *in vitro* cultivation of primary explants of mouse pancreatic epithelial and rat lens tissues.

	M0393	M0650	M2154	M2520	M3769
	[powder]	[10x]	[1x]	[powder]	[powder]
COMPONENT	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
<b>Inorganic Salts</b>					
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.1396	2	0.2	0.2	0.2
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> • 9H <sub>2</sub> O	0.00072	0.0072	0.00072	0.00072	0.00072
MgSO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.09767	0.9767	0.09767	0.09767	0.0967
KCl	0.4	4.0	0.4	0.4	0.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06	—	—	—	—
Na • Acetate (anhydrous)	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
NaHCO <sub>3</sub>	—	—	2.2	—	—
NaCl	8.0	68.0	6.8	6.0	6.8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.04788	—	—	—	—
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhydrous)	—	1.22	0.122	0.122	0.122
<b>Amino Acids</b>					
L-Alanine	0.025	0.25	0.025	0.025	0.025
L-Arginine • HCl	0.07	0.7	0.07	0.07	0.07
L-Aspartic Acid	0.03	0.3	0.03	0.03	0.03
L-Cystine • HCl • H <sub>2</sub> O	0.00011	0.0011	0.00011	0.00011	0.00011
L-Cysteine • 2HCl	0.026	0.26	0.026	0.026	0.026
L-Glutamic Acid	0.0668	0.668	0.0668	0.0668	0.0668
L-Glutamine	0.1	—	—	0.1	—
Glycine	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Histidine • HCl • H <sub>2</sub> O	0.02188	0.2188	0.02188	0.02188	0.02188
Hydroxy-L-Proline	0.01	0.1	0.01	0.01	0.01
L-Isoleucine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Leucine	0.06	0.6	0.06	0.06	0.06
L-Lysine • HCl	0.07	0.7	0.07	0.07	0.07
L-Methionine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
L-Phenylalanine	0.025	0.25	0.025	0.025	0.025
L-Proline	0.04	0.4	0.04	0.04	0.04
L-Serine	0.025	0.25	0.025	0.025	0.025
L-Threonine	0.03	0.3	0.03	0.03	0.03
L-Tryptophan	0.01	0.1	0.01	0.01	0.01
L-Tyrosine • 2Na • 2H <sub>2</sub> O	0.05766	0.5766	0.05766	0.05766	0.05766
L-Valine	0.025	0.25	0.025	0.025	0.025
<b>Vitamins</b>					
Ascorbic Acid • Na	0.0000566	0.0005625	0.0000566	0.0000566	0.0000566
D-Biotin	0.00001	0.0001	0.00001	0.00001	0.00001
Calciferol	0.0001	0.001	0.0001	0.0001	0.0001
Choline Chloride	0.0005	0.005	0.0005	0.0005	0.0005
Folic Acid	0.00001	0.0001	0.00001	0.00001	0.00001
Menadione (sodium bisulfite)	0.000016	0.00016	0.000016	0.000016	0.000016
myo-Inositol	0.00005	0.0005	0.00005	0.00005	0.00005
Niacinamide	0.000025	0.00025	0.000025	0.000025	0.000025
Nicotinic Acid	0.000025	0.00025	0.000025	0.000025	0.000025
p-Amino Benzoic Acid	0.00005	0.0005	0.00005	0.00005	0.00005
D-Pantothenic Acid • ½Ca	0.00001	0.0001	0.00001	0.00001	0.00001

Pyridoxal • HCl	0.000025	0.00025	0.000025	0.000025	0.000025
Pyridoxine • HCl	0.000025	0.00025	0.000025	0.000025	0.000025
Retinol Acetate	0.00014	0.0014	0.00014	0.00014	0.00014
Riboflavin	0.00001	0.0001	0.00001	0.00001	0.00001
DL- $\alpha$ -Tocopherol Phosphate • Na	0.00001	0.0001	0.00001	0.00001	0.00001
Thiamine • HCl	0.00001	0.0001	0.00001	0.00001	0.00001
<b>Other</b>					
Adenine Sulfate	0.01	0.1	0.01	0.01	0.01
Adenosine Triphosphate • 2Na	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Adenosine Monophosphate • Na	0.0002385	0.002385	0.0002385	0.0002385	0.0002385
Cholesterol	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002
Deoxyribose	0.0005	0.005	0.0005	0.0005	0.0005
Glucose	1.0	10.0	1.0	1.0	1.0
Glutathione (reduced)	0.00005	0.0005	0.00005	0.00005	0.00005
Guanine • HCl	0.0003	0.003	0.0003	0.0003	0.0003
HEPES	—	—	—	5.958	—
Hypoxanthine	0.0003	0.003	0.0003	0.0003	0.0003
Phenol Red • Na	0.0213	0.213	0.0213	0.0213	—
TWEEN® 80	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
Ribose	0.0005	0.005	0.0005	0.0005	0.0005
Thymine	0.0003	0.003	0.0003	0.0003	0.0003
Uracil	0.0003	0.003	0.0003	0.0003	0.0003
Xanthine • Na	0.000344	0.00344	0.000344	0.000344	0.000344
<b>ADD</b>					
L-Glutamine	—	0.1 at 1x	0.1	—	0.1
Sodium Bicarbonate	0.35	2.2 at 1x	—	2.2	2.2

	<b>M4530</b>	<b>M5017</b>	<b>M7528</b>	<b>M7653</b>	<b>M9163</b>
	[1x]	[powder]	[1x]	[1x]	[10x]
<b>COMPONENT</b>	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
<b>Inorganic Salts</b>					
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.2	0.2	0.2	0.1396	1.396
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> • 9H <sub>2</sub> O	0.00072	0.00072	0.00072	0.00072	0.0072
MgSO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767	0.9767
KCl	0.4	0.4	0.4	0.4	4.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	—	—	0.06	0.6
Na • Acetate (anhydrous)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.5
NaHCO <sub>3</sub>	2.2	—	2.2	0.35	—
NaCl	6.8	6.8	6.0	8.0	80.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydrous)	—	—	—	0.04788	0.4788
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anhydrous)	0.122	0.122	0.122	—	—
<b>Amino Acids</b>					
L-Alanine	0.025	0.025	0.025	0.025	0.25
L-Arginine • HCl	0.07	0.07	0.07	0.07	0.7
L-Aspartic Acid	0.03	0.03	0.03	0.03	0.3
L-Cystine • HCl • H <sub>2</sub> O	0.00011	0.00011	0.00011	0.00011	0.0011
L-Cysteine • 2HCl	0.026	0.026	0.026	0.026	0.26
L-Glutamic Acid	0.0668	0.0668	0.0668	0.0668	0.668
L-Glutamine	0.1	0.1	—	—	—
Glycine	0.05	0.05	0.05	0.05	0.5
L-Histidine • HCl • H <sub>2</sub> O	0.02188	0.02188	0.02188	0.02188	0.2188
Hydroxy-L-Proline	0.01	0.01	0.01	0.01	0.1
L-Isoleucine	0.02	0.02	0.02	0.02	0.2
L-Leucine	0.06	0.06	0.06	0.06	0.6
L-Lysine • HCl	0.07	0.07	0.07	0.07	0.7
L-Methionine	0.015	0.015	0.015	0.015	0.15
L-Phenylalanine	0.025	0.025	0.025	0.025	0.25
L-Proline	0.04	0.04	0.04	0.04	0.4
L-Serine	0.025	0.025	0.025	0.025	0.25
L-Threonine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.3
L-Tryptophan	0.01	0.01	0.01	0.01	0.1
L-Tyrosine • 2Na • 2H <sub>2</sub> O	0.05766	0.05766	0.05766	0.05766	0.5766
L-Valine	0.025	0.025	0.025	0.025	0.25

<b>Vitamins</b>					
Ascorbic Acid • Na	0.000566	0.000566	0.000566	0.000566	0.000566
D-Biotin	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.0001
Calciferol	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.001
Choline Chloride	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.005
Folic Acid	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.0001
Menadione (sodium bisulfite)	0.000016	0.000016	0.000016	0.000016	0.00016
myo-Inositol	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	0.0005
Niacinamide	0.000025	0.000025	0.000025	0.000025	0.00025
Nicotinic Acid	0.000025	0.000025	0.000025	0.000025	0.00025
p-Amino Benzoic Acid	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	0.0005
D-Pantothenic Acid • ½Ca	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.0001
Pyridoxal • HCl	0.000025	0.000025	0.000025	0.000025	0.00025
Pyridoxine • HCl	0.000025	0.000025	0.000025	0.000025	0.00025
Retinol Acetate	0.00014	0.00014	0.00014	0.00014	0.0014
Riboflavin	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.0001
DL-α-Tocopherol Phosphate • Na	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.0001
Thiamine • HCl	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	0.0001
<b>Other</b>					
Adenine Sulfate	0.01	0.01	0.01	0.01	0.1
Adenosine Triphosphate • 2Na	0.001	0.001	0.001	0.001	0.01
Adenosine Monophosphate • Na	0.0002385	0.0002385	0.0002385	0.0002385	0.002385
Cholesterol	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.002
Deoxyribose	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.005
Glucose	1.0	1.0	1.0	1.0	10.0
Glutathione (reduced)	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	0.0005
Guanine • HCl	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.003
HEPES	—	—	5.958	—	—
Hypoxanthine	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.003
Phenol Red • Na	0.0213	0.0213	0.0213	0.0213	0.0213
TWEEN 80	0.02	0.02	0.02	0.02	0.2
Ribose	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.005
Thymine	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.003
Uracil	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	—
Xanthine • Na	0.000344	0.000344	0.000344	0.000344	—
<b>ADD</b>					
L-Glutamine	—	—	0.1	0.1	0.1 at 1x
Sodium Bicarbonate	—	2.2	—	—	0.35 at 1x

**Fuente:** Formulación Medio 199, Sigma-Aldrich:

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Formulation/m7528for.Par.0001>.

<File.tmp/m7528for.pdf>

### Anexo 3. Formulación del medio TCM-199 usada en este estudio

<b>TCM-199</b>	
<b>(M7528)</b>	
<b>COMPUESTO</b>	[1x]
<b>SALES INORGÁNICAS</b>	g/L
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.2
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0.00072
MgSO <sub>4</sub> (Anhidro)	0.09767
KCl	0.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-
Na · Acetato (Anhidro)	0.05
NaHCO <sub>3</sub>	2.2
NaCl	6.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Anhidro)	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Anhidro)	0.122
<b>AMINOÁCIDOS</b>	
L – Alanina	0.025
L - arginina · HCl	0.07
Ácido L – Aspártico	0.03
L - Cistina · HCl · H <sub>2</sub> O	0.00011
L - Cistina · 2HCl	0.026
Ácido L – Glutámico	0.0668
L – Glutamina	-
Glycina	0.05
L- Histidina · HCl · H <sub>2</sub> O	0.02188
Hidroxi- L – Prolina	0.01
L – Isoleucina	0.02
L – Leucina	0.06
L - Lisina · HCl	0.07
L – Metionina	0.015
L – Fenilalanina	0.025
L – Prolina	0.04
L – Serina	0.025
L – Treonina	0.03
L – Triptófano	0.01
L - Tirosina · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	0.05766
L- Valina	0.025
<b>VITAMINAS</b>	
Ácido Ascórbico · Na	0.0000566
D- Biotina	0.00001
Calciferol	0.0001

Cloruro de Colina	0.0005
Ácido Fólico	0.00001
Bisulfito de sodio de Menadiona	0.000016
<i>myo</i> – Inositol	0.00005
Niacinamida	0.000025
Ácido Nicotínico	0.000025
Ácido p - Amino Benzoico	0.00005
Ácido D - Pantotéico · ½Ca	0.00001
Piridoxal · HCl	0.000025
Piridoxina · HCl	0.000025
Acetato de Retinol	0.00014
Riboflavina	0.00001
DL- α - Trocofenol Fosfato · 2Na	0.00001
Tiamina · HCl	0.00001
<b>OTROS</b>	
Sulfato de Adenina	0.01
Adenosina Trifosfato · 2Na	0.001
Adenosina Monofosfato · Na	0.0002385
Colesterol	0.0002
Deoxyribosa	0.0005
Glucosa	1.0
Glutación (reducido)	0.00005
Guanina · HCl	0.0003
<b>HEPES</b>	<b>5.958</b>
Hypoxantina	0.0003
Rojo de Fenol · Na	0.0213
TWEEN 80 <sup>®</sup>	0.02
Ribosa	0.0005
Timina	0.0003
Uracil	0.0003
Xantina · Na	0.000344
<b>ADICIONAR</b>	
<b>L- Glutamina</b>	<b>0.1</b>
Bicarbonato de sodio	-

**Fuente:** Formulación Medio 199, Sigma-Aldrich:

<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Formulation/m7528for.Par.0001>.

<File.tmp/m7528for.pdf>