

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**“VIABILIDAD POST DESCONGELACIÓN DE OVOCITOS EN
BOVINOS CRIOLLOS SEGÚN DIÁMETRO FOLICULAR
AYACUCHO 2750 m.s.n.m-2016”**

TESIS PARA OBTENER TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIA

PRESENTADA POR:

LUCY VANESSA SULCA ÑAUPAS

AYACUCHO - PERÚ

2017

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Pedro y Yolanda; mis hermanos Vladimir, Carilúz y Grover; a toda mi familia ya que gracias a ellos puedo estar en esta situación y poder aportar con mis conocimientos.

A mis abuelitos Baudilia y Narcizo ya que gracias ellos encontré mi vocación.

A mis compañeros del Laboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal para ellos muchas gracias y que Dios los bendiga.

Lucy Vanessa

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, la Facultad de Ciencias Agrarias, en especial a la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y a su plana de docentes, que compartieron conmigo todo su conocimiento y su experiencia para tener una formación profesional adecuada.

A mi asesor de tesis al Dr. Arturo Rodríguez Zamora, por darme la iniciativa y el apoyo de hacer realidad este trabajo.

Al proyecto: “Implementación de la Transferencia de Embriones en la Ganadería Altoandina Ayacucho-FOCAM”.

Al Matadero de la Comunidad de “Quicapata”- Carmen Alto Ayacucho.

A todas las personas que han formado parte de mi vida estudiantil a las que también me encantaría agradecer su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles. Algunas están aquí conmigo, otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado, por todas sus bendiciones y quiero expresar mi gratitud.

Lucy Vanessa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	12
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Antecedentes	14
1.2 Bovino criollo en el Perú	17
1.3 Gametogénesis.	20
1.4 Foliculogénesis.....	21
1.4.1 Desarrollo folicular preantral	23
1.4.2 Desarrollo de folículos antrales pequeños	24
1.4.3 Fases de desarrollo folicular	26
1.5 Ovogénesis.....	37
1.5.1 Características del ovocito bovino	38
1.5.2 Maduración de ovocitos.	41
1.5.3 Métodos para la obtención de ovocitos.....	43
1.5.4 Clasificación de ovocitos.....	49
1.6 Crioconservación.....	51
1.6.1 Agentes Crioprotectores (ACP).....	52
1.6.2 Método de congelación lenta.	54
MATERIALES Y MÉTODOS	60
2.1 Ubicación.....	60

2.2 Duración	60
2.3 Tamaño de muestra	60
2.4 Materiales	60
2.5 Procedimiento metodológico.....	62
2.6 Variables en estudio	68
2.7 Análisis estadístico	68
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
3.1 Recuperación de ovocitos	70
3.2 Selección y clasificación de ovocitos.....	72
3.3 Congelación y viabilidad post descongelación.....	77
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	88
4.1 CONCLUSIONES	88
4.2 RECOMENDACIONES.....	89
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	90
ANEXO.....	89

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. 1: Folículo antral fuertemente adherido a las células de la granulosa	26
Figura 1. 2: Desarrollo paralelo del folículo y ovocito.....	37
Figura 1. 3: Proceso de ovogénesis.....	38
Figura 1. 4: Modificaciones físicas de la célula en función de la velocidad de enfriamiento	52

ÍNDICE GRÁFICOS

Gráfico 3. 1: Porcentaje de ovocitos según calidad del diámetro D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016	74
Gráfico 3. 2: Porcentaje de ovocitos según calidad del diámetro D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016	75
Gráfico 3. 3: Porcentaje de ovocitos según calidad del diámetro D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016	76
Gráfico 3. 4: Porcentaje de viabilidad post descongelación de ovocitos según diámetro folicular en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.....	78
Gráfico 3. 5: Porcentaje de clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.....	82
Gráfico 3. 6: Porcentaje de clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.....	83

Gráfico 3. 7: Porcentaje de clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016 85

Gráfico 3. 8: Comparación de calidad de ovocitos post descongelación de los diámetros foliculares D1,D2 y D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016..... 85

ÍNDICE FOTOS

Foto 2. 1: Recolección de ovarios en la zona de evisceración Matadero de Quicapata-Ayacucho..... 63

Foto 2. 2: Proceso de aspiración y búsqueda de ovocitos 64

Foto 2. 3: Clasificación de ovocitos antes de la congelación 65

Foto 2. 4: Lavado de ovocitos, aspiración a crioprotector y realización de seeding 66

Foto 2. 5: Criterios de evaluación de la viabilidad de las CC. En A las células incoloras se consideraron como vivas y en B las teñidas se consideraron como muertas..... 67

Foto 2. 6: Clasificación de ovocitos post descongelación en bovinos criollos del Matadero de Quicapata –Ayacucho 2016.....68

ÍNDICE TABLAS

Tabla 3. 1: Promedio de ovocitos recuperados por animal y ovario en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016	70
Tabla 3. 2: Promedio de ovocitos recuperados por animal y ovario según calidad en bovinos criollos del Matadero de Quicapata -Ayacucho-2016	72
Tabla 3. 3: Número de ovocitos según calidad del diámetro D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016	73
Tabla 3. 4: Número de ovocitos según calidad del diámetro D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016	74
Tabla 3. 5: Número de ovocitos según calidad del diámetro D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016	75

ÍNDICE ANEXOS

Anexo 1: Principales morfotipos del criollo ayacuchano en el Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.....	110
Anexo 2: Materiales para búsqueda y selección de ovocitos	111
Anexo 3: Materiales para evaluación post descongelación de ovocitos	111
Anexo 4: Proceso de tinción por exclusión azul de tripán en ovocitos obtenidos de bovinos criollos	112
Anexo 5: Ovocitos post descongelación de diámetros D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.....	112

Anexo 6: Ovocitos post descongelación de diámetros D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.....	113
Anexo 7: Ovocitos post descongelación de diámetros D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.....	113
Anexo 8: Daños morfológicos en ovocitos post descongelación en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.	114
Anexo 9: Colección de ovarios por día en el Matadero de Quicapata-Ayacucho-2016.....	114
Anexo 10: Preparación de solución salina al 0.9 %	115
Anexo 11: Preparación de medio de manipulación	115
Anexo 12: Microscopio Accu Scope®.....	115
Anexo 13: Estereoscopio Nikon®	116
Anexo 14: Congeladora Freeze Control CL 5500 Cryologyc®.....	116
Anexo 15: Registro de colección de ovarios y ovocitos de bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

(CGP)	Células Germinales Primordiales
(LH)	Hormona Luteinizante
(FSH)	Hormona Folículo Estimulante
(EGF)	Factor de Crecimiento Epidermal
(GDF9)	Factor de Crecimiento de Diferenciación
(BMP15)	Proteína Morfogenética Ósea
(CC)	Células del Cúmulo
(ZP)	Zona Pelúcida
(AT)	Azul de Tripán
(PKA)	Proteín Kinasa A
(PKB)	Proteín Kinasa B
(PKC)	Proteín Kinasa C
(ERK)	Kinasas Reguladoras Extracelulares
(MAPK)	Proteín Kinasas Activadoras de Mitógeno
(PI3K)	Kinasas del 3 Fosfatidil Inositol
(AMPc)	Adenosín Monofosfato Cíclico
(ARNm)	Ácido Ribonucleico Mensajero

(Cx43)	Proteína Conexina 43
(IGF-I)	Factor de Crecimiento Insulinoide tipo I
(IGF-II)	Factor de Crecimiento Insulinoide tipo II
(PAPP-A)	Proteína Plasmática Asociada a la Preñez Tipo A
(TGF α)	Factor de Crecimiento Transformador α
(TGF β)	Factor de Crecimiento Transformador β
(GH)	Hormona de Crecimiento
(SOD)	Superóxido Dismutasa
(VG)	Vesícula Germinal
(CD44)	Glicoproteína Implicada en la Adhesión entre Células
(OPU)	Ovum Pick Up
(FIV)	Fecundación In Vitro
(MII)	Metafase II
(PI)	Profase I
(IGFBP)	Proteínas Ligadas al Factor de Crecimiento Insulinoide
(MCL-1)	Proteína de Diferenciación de Celula Mieloide 1
(FADD)	Fas-Proteína Asociada con el Dominio de la Muerte
(COX-1)	Ciclooxigenasa 1
(SIVA)	Genes Proapópticos

- (TIAF 1) Inductor Anti Apóptico Factor 1
- (LASS4) Homólogo de Longevidad y Aseguramiento 4
- (TNFSF8) Miembro de Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral 8
- (DRAK-2) Proteína Quinasa Relacionada con la Muerte 2
- (BTG-3) Factor Anti-Proliferación 3
- (MRPL41) Proteína Mitocondrial Ribosómica L 41
- (VDAC2) Anión Dependiente del Voltaje del Canal 2
- (STX7) Sintaxina 7
- (SPC22) Factor de Célula Subordinada 22
- (EHD3) Dominio EH 3
- (TNF α) Factor de Necrosis Tumoral Alfa
- (CAD) DNasa Activadora de Caspasas
- (Apaf -1) Factor 1 Activador de Proteasas Apoptóticas
- (TS-BCLL) Candidato Humano Supresor de Tumores para Celula B
- (CYP 17) Enzima 17 α Hidroxilasa
- (3BHSD) Proteína 3 Beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa
- (VEGF) Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
- (NGF) Factor de Crecimiento Neuronal
- (StAR) Proteína Reguladora de la Estereidogénesis Aguda

- (ZP) Glicoproteína de la Zona Pelúcida 1, 2,3 y 4
- (MHz) Mega Hertz
- (DMSO) Dimetilsulfóxido
- (EG) Etilenglicol
- (CCOs) Complejo Ovocito Células del Cúmulus
- (CPA) Agente Crioprotector
- (NL₂) Nitrógeno Líquido
- (PROH) Alcohol Propílico
- (CP) Crioprotector

RESUMEN

El vacuno criollo en el Perú cuenta con una población muy heterogénea en morfotipos, con adaptaciones a diversos ecosistemas (resistencia a enfermedades, altitud, rusticidad, sobriedad) y con alto valor potencial como fuente de genes útiles, esto conlleva a una situación preocupante por ser un recurso amenazado por ausencia de planes de conservación y cruzamientos indiscriminados con otras razas; por lo tanto, urge la necesidad de implementar biotecnologías reproductivas orientadas a la criopreservación. El estudio tuvo como objetivo comparar la viabilidad post descongelación de ovocitos de vacunos criollos obtenidos de tres diferentes diámetros foliculares procedentes del Matadero "Quicapata". Los vacunos criollos fueron seleccionados por morfología antes mortem. Los ovarios fueron transportados en solución salina fisiológica (0.9%) temperada, los parámetros foliculares considerados fueron D1 ($\geq 1\text{mm} < 3\text{mm}$), D2 ($\geq 3\text{mm} < 5\text{mm}$) y D3 ($\geq 5\text{mm} < 7\text{mm}$) que fueron aspirados y colocados en medio de manipulación suplementado con 2% de suero fetal bovino. Los ovocitos recuperados fueron seleccionados por el número de capas de los cúmulos y homogeneidad del citoplasma. Sólo los ovocitos de calidad excelente y buena fueron expuestos a un crioprotector comercial (EG), cargados en pajuelas de 0.25 ml y mediante congelación lenta automatizado criopreservados en nitrógeno líquido. La evaluación post descongelación se realizó con tinción azul de tripán (0.05%). A la evaluación los diámetros D1 y D2 son de mayor viabilidad que D3, obteniendo una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) al menos en dos parámetros, estos resultados ayudarán a estandarizar protocolos de congelación para los ovocitos.

Palabras clave: vacuno criollo, diámetro folicular, ovocitos, congelación.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad hay la necesidad de conservar especies vulnerables o en peligro de extinción, es el caso del bovino criollo que es considerado un recurso marginal, siendo sustituido por especies y razas exóticas mejoradas, que estaría provocando procesos de erosión genética desaprovechando su condición de raza primaria. Por otra parte la crioconservación de células vivas es una herramienta que permite el almacenamiento indefinido del material biológico proveniente de diversas especies animales sin pérdida funcional de su actividad y sin alteraciones genéticas, esto posibilitaría el aprovechamiento del gran potencial de genes útiles del bovino criollo adquirido a través del tiempo por su adaptación a diversos ambientes. Actualmente ya es posible crioconservar ovocitos, semen y embriones de algunas especies de mamíferos mediante protocolos de congelación lenta o vitrificación, pero en la mayoría de los casos estos son aún subóptimos teniendo bajos rendimientos en número de embriones obtenidos de ovocitos descongelados, posteriormente madurados y fertilizados por fecundación *in vitro* pues no superan el 5 %, por esta razón se quiere ahondar en el estudio de protocolos estandarizados de obtención y crioconservación de ovocitos, mediante el estudio de la viabilidad post descongelación de ovocitos según el diámetro de origen.

De este modo se obtendrá un protocolo ideal de crioconservación para contribuir en futuras investigaciones, en el campo de la producción pecuaria

y científico - experimental, por lo tanto los objetivos del presente trabajo fueron:

- Determinar la viabilidad post descongelación de ovocitos en bovinos criollos obtenidos de diámetro folicular $\geq 1 < 3$ mm.
- Determinar la viabilidad post descongelación de ovocitos en bovinos criollos obtenidos de diámetro folicular $\geq 3 < 5$ mm.
- Determinar la viabilidad post descongelación de ovocitos en bovinos criollos obtenidos de diámetro folicular $\geq 5 < 7$ mm.

I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 ANTECEDENTES

En cuanto a congelación lenta de ovocitos, la primera gestación humana conseguida con ovocitos congelados fue publicada por Chen y sus colaboradores (1986), el análisis de la literatura acerca de los resultados obtenidos con la congelación lenta, se hace un poco difícil, debido principalmente a que existe una heterogeneidad considerable en cuanto al protocolo de congelación aplicado, los CPA utilizados, su concentración, escaso número de ovocitos utilizados en los estudios, naturaleza de los mismos (envejecidos, madurados *in vitro*, fallos de fecundación), etc. En los últimos años, los protocolos de congelación lenta han evolucionado Considerablemente y se han introducido varias modificaciones relacionadas principalmente con la mezcla de CPA.

El primer informe acerca de un nacido humano tras la congelación de ovocitos utilizando el 1, 2-Propanodiol (1, 5 M PROH) y sacarosa (0,2M) como CPA fue publicado por Porcu y colaboradores (1997). Posteriormente se publicaron varios casos clínicos, que resultaron en gestaciones y nacimientos utilizando esta misma técnica.

La utilización de estos protocolos fue relativamente ineficiente debido a la baja tasa de supervivencia y al limitado potencial de los ovocitos que sobrevivieron. Estos protocolos fueron modificados, intentando mejorar su eficacia, una de estas modificaciones, fue elevar la concentración de sacarosa, con el fin de aumentar la ratio de deshidratación y con ello, disminuir las posibilidades de cristalización durante el proceso.

En la última década fueron publicadas trabajos como por Fabbri *et al.* (2000) donde hubo una modificación significativa a los protocolos de congelación lenta utilizando PROH y sacarosa, ha sido la sustitución los iones de sodio en el medio base, por otro catión: la colina. Esta aproximación fue testada inicialmente en ratón, consiguiéndose muy buenos resultados de supervivencia (90%) y gestación (40%) (Stachecki *et al.*, 2002); Martínez *et al.* (2011) un 50% de viabilidad. Según un meta-análisis realizado por Oktay y colaboradores (2006) concluyó que el éxito real de la congelación lenta a través de los diferentes protocolos es de sólo el 2,2% por embrión generado; el 2,3% de tasa de gestación por ovocito descongelado; o del 20,1% de tasa de gestación clínica por transferencia. Las primeras investigaciones en congelación lenta de ovocitos bovinos fueron reportados por Lim *et al.* (1991), Fuku *et al.* (1992) y Otoi *et al.*

(1995); y más adelante Mavrides y Morroll (2002) encontraron que, en ovocitos congelados por el método lento, que fueron posteriormente descongelados y cultivados por 2 horas, la tasa de supervivencia fue de 54%; en Mexico Zárate (2006) obtuvo un 27 % de viabilidad, respectivamente a la evaluación morfológica.

Asimismo el uso del azul tripán que es un colorante azoico que se utiliza para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas, el estudio de la viabilidad y la proliferación celular es un factor importante para evaluar las respuestas de una o varias poblaciones celulares a diferentes factores la penetración del azul tripán en el citoplasma de las células con membrana plasmática alterada se usa comúnmente en microscopía para diferenciar las células vivas de las muertas, también llamado método de tinción por exclusión porque el colorante no ingresa en las células vivas sino en las muertas (Filipiak y Larocca, 2012).

El AT es una tinción supravital que se utiliza para determinar la viabilidad de células (Manual Merck, 2004). Existen antecedentes de su uso en diferentes especies, pero la información en bovinos es escasa (Coelho *et al.*, 1998). Existen datos del uso de AT en células germinales fetales (Kato y Tsunoda, 1996); en folículos preantrales (Jewgenow y Stolte, 1996); ovocitos de hamsters (Lewin *et al.*, 1990); ovocitos de búfalo (Gupta *et al.*, 2002); CCOs de gatas (Calvo *et al.*, 2015); ovocitos de cerdos (Fernández *et al.*, 2012).

Investigaciones sugieren que los COC fertilizados in vitro, aproximadamente un 54% son fecundados. Este estudio determina la proporción de COC inmaduros muertos, los cuales no se van a fertilizar, por lo cual sería de utilidad como medida rutinaria para hacer más eficiente la FIV. El trabajo fue diferenciar ovocitos vivos y muertos mediante la aplicación del AT, seleccionando los vivos, que pueden ser fecundados y evolucionar a embriones (Larocca *et al.*, 2004).

Gupta y colaboradores (2002), utilizando el AT en ovocitos de búfalo, concluyeron que la exposición durante 2 minutos resulta la más adecuada. No se obtienen diferencias significativas en clivaje y embriones desarrollados lo cual indica que el AT no tiene efectos adversos en la maduración y desarrollo a mórulas compactas.

1.2 BOVINO CRIOLLO EN EL PERÚ

El bovino criollo en el Perú se originó a partir de los cruces de razas bovinas de las regiones de Extremadura, Andalucía, Murcia y Cataluña que fueron introducidas por Cristóbal Colon en América en su segundo viaje, en 1493 (Primo, 1992); en la actualidad los bovinos criollos en nuestro país son un conjunto de poblaciones muy heterogéneas, con numerosos morfotipos y adaptaciones locales escasamente estudiadas.

Del total de ganado vacuno existente en el Perú, el 63% representa ganado Criollo (Censo Agropecuario 2012-INEI). En realidad, ese porcentaje engloba al ganado Criollo con diferentes grados de cruzamiento con otras razas introducidas al país. Se estima que el ganado bovino Criollo

mantenido como puro representaría una cifra mucho menor, que oscilaría alrededor del 20% (Delgado y García, 2016).

Estos animales, también denominados “chuscos”, cumplen un rol importante en la vida de las comunidades campesinas: son fuente de proteínas - carne, leche, queso, fuerza de trabajo y de ahorro pues cotidianamente venden el queso que se produce con la leche o en casos de emergencia o necesidad de liquidez, venden a los animales mismos, fertilizantes, cuero, entre otros. Los diversos ecosistemas a los cuales se han adaptado, los hacen de gran valor potencial como fuente de genes útiles (genes de resistencia a enfermedades, de rendimiento productivo y reproductivo, etc); y servicios ambientales (contribuyen al manejo apropiado de hábitats seminaturales) (Rege y Gibson, 2003).

En los sistemas tradicionales de producción y mejoramiento genético existe un prejuicio por los animales criollos, considerándolos como un recurso marginal que debe ser sustituido por especies y razas exóticas mejoradas. La política nacional de desarrollo ganadero, propone el incremento de la productividad a partir de la importación de reproductores con una alta tasa productiva pero con poca o ninguna adaptación a las condiciones extremas de los Andes del Perú; también se comercializa semen importado de EEUU de toros de las razas Holstein, Brown Swiss, Aberdeen Angus, Jersey, entre otros (Comisión Nacional de Recursos Zoogenéticos, 2004).

Ello estaría provocando procesos de erosión genética con la probable pérdida de genes de resistencia y/o adaptación y reemplazados por otros

seleccionados para sistemas de producción con una elevada relación consumo/producción. Además se deja de aprovechar la condición de raza primaria del bovino criollo peruano; en ausencia de programas de selección y mejora, se pierde el potencial que significa las adaptaciones locales y su facilidad para aprovechar mejor los recursos de su difícil ambiente.

Esta problemática es agravada por los pocos trabajos de investigación en caracterización y estudios de diversidad que se han realizado en los bovinos criollos en el país.

Desde el año 2003 se vienen desarrollando actividades relacionadas con la conservación, caracterización e identificación de caracteres utilitarios de los recursos zoogenéticos (Rivas *et al.*, 2004), con énfasis en especies domésticas como los bovinos criollos, habiéndose identificado poblaciones en las regiones de Ancash, Ayacucho, Apurímac, Junín y Puno (sierra norte, centro y sur del Perú) a fin de establecer la existencia de uno o más morfotipos definidos que podrían constituir la base de nuevas razas bovinas en el Perú. Antes de la domesticación actuaba solo la selección natural; posteriormente a la acción consciente y directa del hombre a través de una reproducción dirigida en base a una selección fenotípica sobre determinados caracteres morfológicos y productivos, se fueron singularizando diversos grupos de cada especie en cada región, conduciendo a la aparición y consolidación de razas concretas (Sierra, 2001).

Desde hace 500 años estos animales vienen experimentando un proceso de adaptación a las condiciones medioambientales principalmente de la sierra del Perú. Su producción se localiza en valles interandinos y puna alto andina, donde razas mejoradas no pueden desarrollarse. No obstante, poco se ha hecho para caracterizar genética y productivamente a las poblaciones de bovinos criollos del Perú. No contamos con razas caracterizadas de bovinos criollos, a diferencia de nuestros vecinos de los otros países sudamericanos como Colombia, Bolivia y Brasil, entre otros.

Asimismo, persiste la idea equivocada de que el mejoramiento del bovino criollo debe ser realizado a través del cruzamiento con razas exóticas y no a través de la selección y mejora de los criollos (Rosemberg, 2002).

1.3 GAMETOGÉNESIS.

La gametogénesis es un proceso mediante el cual se forman los gametos masculinos y femeninos, la ovogénesis es el proceso de formación de los ovocitos, este proceso es discontinuo y se inicia en la vida intrauterina, después de los primeros días post fecundación. Las células germinales primordiales (CGP) se encuentran en el epiblasto (capa externa principal del blastocisto o blástula) de donde posteriormente migran al endodermo del saco vitelino y se multiplican por mitosis. Finalmente las CGP del endodermo del saco vitelino pasan a la futura gónada indiferenciada, donde se van a diferenciar en ovogonias en los ovarios y espermatogonias en el testículo (Werven y Amon, 2001).

Al final del tercer mes de gestación, las ovogonias ya se encuentran rodeadas de una capa de células epiteliales planas precedentes de la

superficie del ovario varios millones de ovogonias inician la primera división meiótica y aproximadamente en el 7 o 8 mes, cada célula se encuentra en la etapa de diploteno.

En esta etapa los ovocitos primarios entran en una fase de detención de la primera división meiótica hasta alcanzar la pubertad, donde por la acción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) se reanuda la meiosis, hasta su maduración (Gilbert, 2005).

1.3 FOLICULOGÉNESIS

Los folículos primarios contienen al ovocito con una capa de epitelio cuboidal de células foliculares. Recientemente se ha puesto atención en moléculas específicas secretadas por el ovocito, que son importantes para la comunicación entre el ovocito y las células foliculares. Existen factores de crecimiento específicos para el desarrollo del ovocito y que son fundamentales: el factor de crecimiento de diferenciación (GDF9) y la proteína morfogenética ósea (BMP15). El GDF9 y la BMP15 son necesarios para la foliculogénesis temprana y son los principales reguladores de la diferenciación de las células de la granulosa y células del cúmulo (CC) (Gilchrist *et al.*, 2008).

El folículo secundario tiene una estructura de dos o más capas de células foliculares que rodean al ovocito, el cual empieza a secretar la zona pelúcida (ZP). El folículo secundario llegará a ser un folículo antral con tres capas de células: la teca externa, teca interna y células de la granulosa que forman una cavidad con líquido folicular, a este tipo de folículo también se le conoce como folículo terciario. Para que se forme este antro las células

de la granulosa se diferencian en dos líneas anatómicamente y funcionalmente distintas. Las células de la granulosa mural que se ubican en las paredes del folículo, tienen principalmente funciones esteroideogénicas, y las CC que están asociadas íntimamente con los ovocitos poseen proyecciones citoplasmáticas especializadas, que penetran la ZP y forman uniones de comunicación con el ovocito formando una elaborada estructura llamada complejo-ovocito-células del cúmulo (COC) (Gilchrist *et al.*, 2008).

El proceso de la maduración del ovocito se inicia por influencia de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), que estimulan la proliferación y diferenciación celular del folículo, adquiriendo la capacidad esteroideogénica en este momento los folículos dependen absolutamente del aporte gonadotrófico (Uribe *et al.*, 2009). Es común que un grupo de folículos empiecen a desarrollarse conjuntamente (reclutamiento folicular) y que al final uno de ellos, el folículo dominante sea el destinado a ovular este folículo también es conocido como preovulatorio o folículo de Graaf (Sebger, 2003).

Las hembras adultas de los mamíferos poseen ovarios con una reserva de folículos mayoritariamente inactivos que se desarrollaron durante la vida fetal o poco tiempo después del nacimiento. Algunos de estos folículos iniciarán su crecimiento continuamente hasta que esta reserva se agote (Hatzirodos *et al.*, 2004). El crecimiento del folículo primordial culmina con la ovulación o su degeneración, como ocurre con la mayoría. Dependiendo de la especie, los folículos de mayor tamaño son los encargados de la

mayor producción de hormonas como los estrógenos, tres son sintetizados por los ovarios, hasta el momento en el cual el pico preovulatorio de LH aumenta, con lo cual los estrógenos disminuyen (Hafez *et al.*, 2002).

Las CG mantienen una estrecha comunicación bidireccional con el ovocito, esta comunicación es crucial para la maduración y la calidad del ovocito (Devjak *et al.*, 2012) juegan un papel importante en el desarrollo del ovocito y el aporte de nutrientes, también participan en el mantenimiento del arresto meiótico, la supresión de la actividad transcripcional y la inducción de la maduración meiótica y citoplasmática del ovocito. El ovocito por su parte regula el desarrollo y actividad de las CG durante todo el curso de la foliculogénesis (Su *et al.*, 2009).

Los diversos fenómenos que están implicados en el crecimiento, maduración y luteinización del folículo de Graff (folículo ovárico maduro) son dependientes de diversos patrones específicos de secreción de hormonas como la FSH y LH, además de otras hormonas como las prostaglandinas. El papel de la hormona FSH es muy amplio, ya que participa en la formación del antro, estimula la mitosis de las CC y la formación del líquido folicular, y además induce la sensibilidad de las CC hacia la LH al incrementar el número de receptores para esta hormona (Hafez *et al.*, 2002).

1.4.1 DESARROLLO FOLICULAR PREANTRAL

El antro folicular es aquella cavidad formada por el acúmulo de fluido rico en hormonas esteroideas, especialmente estrógenos, el cual es formado en el ovario bovino cuando el folículo tiene entre 250 y 500 micras

de diámetro. Los estadios previos a la formación del antro son denominados preantrales. Los folículos preantrales se originan en la hembra desde la vida embrionaria con el surgimiento de las *células germinales primordiales* en el saco vitelino, que migran y una vez se alojan en la cresta gonadal originan a las oogonias, las cuales son rodeadas de un grupo de células aplanadas llamadas pregranulosas denominándose esta estructura *folículo primordial* (Palma, 2008).

El proceso de selección de oogonias a folículos primordiales es muy activo, y se ha calculado que en el bovino de 2.700.000 oogonias iniciales durante la vida fetal, al momento del nacimiento quedan unos 135.000 folículos primordiales. Posterior al nacimiento, las células pregranulosas sufren un proceso de diferenciación, cambiando su apariencia aplanada por una capa de células cúbicas y aquí se denominan *folículos primarios*. Conforme las células granulosas van proliferando y formando varias capas alrededor del oocito (entre 2 y 6 capas), originan los *folículos secundarios*. En la última fase de desarrollo, el folículo inicia la formación del antro y crece en diámetro a gran velocidad denominando este estado *folículo terciario o antral*. Finalmente, el folículo antral de mayor desarrollo destinado a la ovulación es denominado *folículo de Graaf* (Palma ,2008).

1.4.2 DESARROLLO DE FOLÍCULOS ANTRALES PEQUEÑOS

El folículo pequeño con reciente formación de su antro crece lentamente (tarda 27 días en pasar de 0.13 a 0.67 mm); a medida que aumenta su diámetro, se acelera la velocidad de crecimiento (6.8 días para pasar de 0.68 a 3.67 mm). Se estima que se requieren 2 ciclos estrales

para que un folículo pase de preantral a antral y que este cambio no se relaciona con cambios en la concentración de gonadotropinas ni con la emergencia de ondas foliculares (Adams *et al*, 2008).

Estudios recientes reportan que la Hormona Folículo Estimulante (FSH) se une a sus receptores en las células granulosas de los folículos primarios, pero parece que esta unión es incapaz de activar el sistema de segundos mensajeros de la adenil ciclasa y por lo tanto no induce señalización celular para producción de proteínas. Solamente cuando alcanzan de 1 a 3 mm de diámetro los folículos responden a FSH. Recientes estudios sobre dominancia folicular plantean que el futuro folículo dominante es el primero en alcanzar 1 mm de diámetro, emerge 6 a 12 horas antes del primer folículo subordinado y su tamaño es mayor (Adams *et al.*, 2008).

La formación del antro folicular es debida a que las células granulosas producen hialurona y versican (un proteoglicanos tipo condroitín - sulfato) que generan un gradiente osmótico que atrae fluidos procedentes de los capilares de la teca. El inhibidor de la inter-alfa tripsina también se encuentra en este fluido; éste puede ligarse al versican o a la hialurona, resultando en la retención de éstas moléculas dentro del antro folicular. Las acuaporinas (moléculas que facilitan el transporte de agua en la célula) también están presentes en las células granulosas, por lo que también pueden estar implicadas en el transporte de agua al interior del folículo (Rodgers e Irving-Rodgers, 2010).

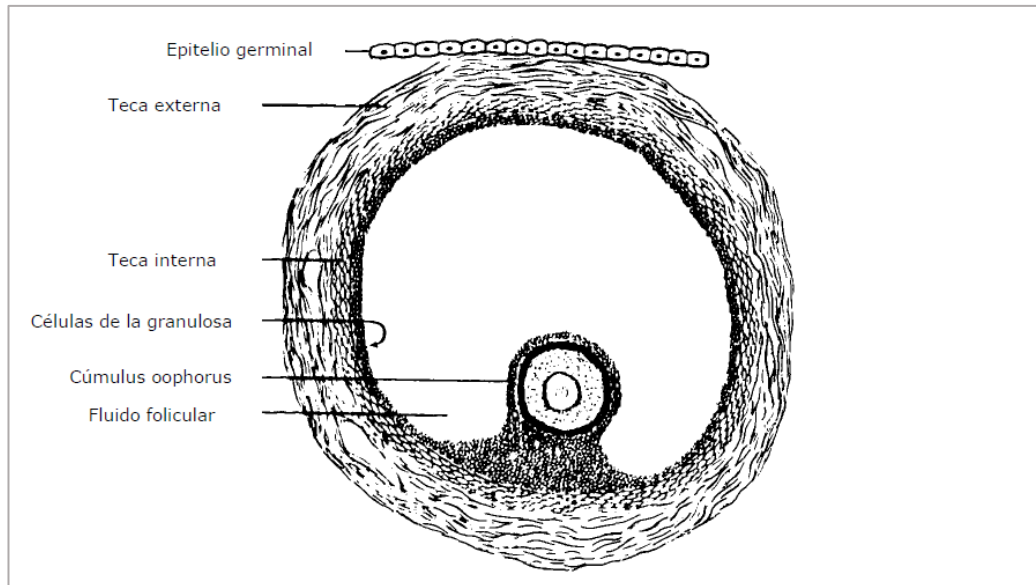


Figura 1. 1: Folículo antral fuertemente adherido a las células de la granulosa

FUENTE: (Gordon, 1996)

1.4.3 FASES DE DESARROLLO FOLICULAR

El desarrollo de los folículos antrales bovinos y su posterior selección y dominancia dependen de la sensibilidad de éstos a las gonadotropinas. El desarrollo folicular se puede delimitar en 3 períodos: reclutamiento, selección y dominancia (Senger, 2005). Los mecanismos de expresión génica son variables a lo largo del tiempo, por lo que en las células de la granulosa, la teca y el oocito se incrementa la expresión específica de algunos genes y sus productos. Estas relaciones son las que se detallarán a continuación.

1.4.3.1 RECLUTAMIENTO

Es definido como la iniciación del crecimiento de una cohorte de folículos dependientes de gonadotropinas principalmente FSH (Ptaszynska, 2008). Se caracteriza por el crecimiento simultáneo de 8 a 41

folículos hasta 4 mm de diámetro en los 2 ovarios. La FSH se une a sus receptores en la granulosa induciendo la transcripción para la producción de la aromatasa P450, la cual media la conversión a estrógenos de la testosterona proveniente de las células de la teca. El inicio de actividad de la aromatasa en la célula granulosa es un indicador de madurez del folículo en la fase de reclutamiento (Webb *et al.*, 1998; Adams, 1999; Diancúrt, 2001; Palma, 2008).

La FSH induce cascadas de señalización que pueden ser mediadas por Proteín Kinasa A (PKA), Proteín Kinasa C (PKC), Kinasas Reguladoras Extracelulares (ERK), Proteín Kinasas Activadoras de Mitógeno de la p38 (MAPK) y Kinasas del 3 Fosfatidil Inositol (PI3K). Junto con la Hormona Luteinizante (LH), la FSH ligada a sus receptores activan cascadas de señalización que inducen la producción de AMPc y PKA, que promueven crecimiento y proliferación celular. Se ha encontrado que la supervivencia de las células granulosas es mediada parcialmente por cascadas de señalización lideradas por PKA, PKB, PKC y MAPK (Forde *et al.*, 2008). Para la competencia oocitaria solo se han descrito 2 activadores de cascadas de señalización: la PKA y la PKC (Sirard *et al.*, 2007).

Otro efecto de la FSH sobre las células de la granulosa es el estímulo a la expresión de ARNm que codifica la síntesis de la proteína conexina Cx43, la cual hace parte de puentes celulares o uniones gap localizadas entre la granulosa y el oocito, o entre la granulosa y la teca estos puentes facilitan el intercambio de iones, impulsos eléctricos y moléculas menores de 1 kilo Dalton entre estos grupos celulares (Palma, 2008).

El reclutamiento folicular se encuentra influenciado positivamente por el Factor de Crecimiento Insulinoide tipo I (IGF-I) y negativamente por la folistatina. El efecto de la IGF-I ha sido demostrado mediante la administración exógena de Hormona de Crecimiento (GH) que indujo el incremento de las concentraciones de IGF-I, lo que resultó en un aumento en el número de folículos reclutados en la cohorte. La aplicación de anticuerpos contra folistatina en vacas resultó en un incremento en el número de folículos de la cohorte, lo que demuestra el efecto antagónico de la folistatina en la producción de FSH, y consecuentemente en el reclutamiento folicular (Adams *et al.*, 2008).

1.4.3.2 SELECCIÓN

En una segunda fase, el número de folículos en crecimiento disminuye por atresia de folículos subordinados. La atresia se puede definir como la reabsorción de líquidos del antro folicular con apoptosis de los componentes celulares del folículo (oocito, células de la granulosa y de la teca). Esto coincide con la disminución en las concentraciones de FSH, que ocurre de 3-4 días después del reclutamiento (Driancourt, 2001; Adams, 2008). Esta disminución es atribuida a la acción combinada entre la inhibina y el estradiol sobre la secreción hipofisaria de FSH que afecta el crecimiento de los folículos menores de 5mm de diámetro, los cuales también reducen su sensibilidad a gonadotropinas (Driancourt, 2001; Ptaszynska, 2008).

La FSH induce en la granulosa la producción de activina en algunos folículos, (estimulando un mecanismo de retroalimentación positiva con la

FSH) y adicionalmente la de folistatina, que incrementa sus niveles conforme aumenta el tamaño folicular. La folistatina tiene la propiedad de ligarse a la activina en el fluido folicular disminuyendo la activina libre, dando como consecuencia un aumento de la relación inhibina: activina (Driancourt, 2001).

El folículo dominante es el primero en un grupo de folículos reclutados en expresar receptores de LH en las células de la granulosa. Los receptores para FSH se encuentran solamente en las células de la granulosa, mientras los de LH se localizan tanto en granulosa como en teca. Durante el *nadir* (nivel más bajo) de secreción hipofisiaria de FSH, el folículo dominante adquiere más receptores de LH en sus células de la granulosa y el crecimiento folicular se hace dependiente de LH, por lo que los folículos subordinados que son incapaces de producir alta cantidad de receptores de LH, se atresian. Esto se da en bovinos cuando los folículos adquieren un diámetro de unos 6.8 a 8 mm (Driancourt, 2001; Adams, 2008). Aparte de su mayor tamaño, el folículo dominante también presenta diferencias con los subordinados en cuanto al mayor grosor de su pared (Salamone *et al*, 1999; Adams *et al*, 2008).

En el folículo hay 3 fenómenos de señalización celular necesarios para que se presente el estatus de dominancia. El primero es la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa. Segundo, hay una disminución selectiva en las cantidades del dímero de inhibina de 34 k Daltons presente en el fluido folicular, lo que no ocurre en inhibinas mayores de 160 k Daltons (Driancourt, 2001; Moore *et al*, 2006) Tercero,

hay una reducción de las proteínas ligadas a IGF tales como la IGFBP2, IGFBP4 e IGFBP5 en el folículo dominante.

La disminución de IGFBP2 ocurre por menor producción, ya que la FSH en la granulosa suprime la producción de ARNm de IGFBP2; mientras que IGFBP 4 y 5 disminuyen debido a un incremento en la proteólisis. La FSH induce en las células granulosas la producción de Proteína Plasmática Asociada a la Preñez tipo A (PAPP-A), una proteasa que puede desnaturalizar el IGFBP4. El efecto resultante es el incremento en los niveles de IGF-I libre en granulosa e IGF- II en teca (Driancourt, 2001; Moore *et al*, 2006; Lucy, 2007).

En la vaca, el gen de expresión de IGF-II está restringido a la teca de folículos antrales, y entre sus funciones ha demostrado estimular estereoidogénesis de las células mediante la activación de receptores de IGF tipo I (28; 37; 38). Entre tanto IGF-I en granulosa tiene un efecto sinérgico con la FSH para incrementar la actividad de la aromatasa en la célula, promoviendo la síntesis de esteroides. Se ha demostrado que el folículo dominante de una cohorte es el de mayor concentración de IGF-I en su líquido antral (Webb *et al*, 1998; Moore *et al*, 2006).

Otros factores de inhibición del desarrollo folicular incluyen al Factor Transformador de Crecimiento Alfa (TGF α), la superóxido dismutasa (SOD) y la proteína 90 de shock térmico, las cuales pueden disminuir la actividad de la aromatasa y consecuentemente la producción de estradiol por las células granulosas, aunque se desconoce si estas sustancias son preferencialmente producidas por el folículo dominante para inhibir los

demás folículos. Algunos miembros de la superfamilia del TGF β , tales como las Proteínas Morfogenéticas del Hueso tipo 4, 6 y 7 (BMP), junto con las IGF, inducen producción de estradiol, inhibina- A, activina-A, folistatina, y proliferación de las células de la granulosa (Webb *et al*, 2004 ; Webb *et al*, 2007 ; Palma, 2008). La inhibina producida por las células de la granulosa puede tener efectos paracrinós sobre las células de la teca estimulando la producción de andrógenos, particularmente la testosterona, lo que puede relacionarse con incrementos en el reclutamiento folicular (Palma, 2008).

Existen algunos factores que contribuyen en esta etapa a la maduración folicular en folículos de 6 mm de diámetro se ha identificado que la relación inhibina- activina y la relación entre Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) Factor Transformador de Crecimiento Alfa (TGF α), tienen propiedades estimuladoras de crecimiento y antiapoptóticas. Éstas junto con el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) hacen parte de la superfamilia del TGF β que interviene en el desarrollo folicular (Driancourt, 2001; Webb *et al*, 2004; Palma, 2008). El EGF y sus receptores se encontraron en oocito y la granulosa, mas no en la teca. En el oocito no se encuentra ARNm que codificara la síntesis de EGF, lo que da a entender que el factor de crecimiento ingresa al oocito proveniente de la granulosa a través de las proyecciones tranzonales de la zona pelúcida (Palma, 2008).

Ciertos estudios de expresión génica en folículos de 2 a 6 mm, mostraron que las células granulosas de los folículos dominantes disminuyeron los niveles de expresión de ARNm para el receptor de FSH, inhibina alfa, receptor de activina A tipo I, ciclina D2, Proteína de

Diferenciación de Célula Mieloide (MCL-1), DICE-1 y también disminución de expresión de genes proapoptóticos FADD y SIVA. El ARNm para receptor beta de estrógenos en el folículo dominante en algunos estudios aparece como incrementado y en otros disminuido. Las células granulosas incrementaron paulatinamente la expresión de aromatasa y receptor de LH y en la teca se incrementó la expresión de factores relacionados con proliferación celular (TIAF1), supervivencia (LASS4), y apoptosis (TNFSF8). Otro hallazgo es que la relación estrógenos: progesterona se encuentra disminuida en el líquido folicular en la fase de dominancia (Evans *et al*, 2004; Mihn *et al*, 2006).

Se ha encontrado también que la concentración de estrógenos en el folículo dominante es más alta que en el mayor de los subordinados y que la baja concentración de estrógenos intrafoliculares se ha asociado a la expresión de ARNm de células granulosas para factores proapoptóticos tales como fas, fas ligando, beta glicano, Ciclooxygenasa 1 (COX-1), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF α), DNAsa activadora de caspasas (CAD) y DRAK-2. En la teca de folículos subordinados entrando en atresia se incrementaron los factores beta glicano, caspasa 13, p58, Factor 1 Activador de Proteasas Apoptóticas (Apaf-1), BTG-3 y Candidato Humano Supresor de Tumores para Células B (TS-BCLL) (Evans *et al*, 2004). En otro estudio se ha asociado la sobreexpresión de algunos genes con apoptosis (MRPL41, VDAC2), fagocitosis de células de folículos en atresia (STX7) y regresión de folículos subordinados (SPC22 y EHD3) (Zielak *et al.*, 2007).

Durante la involución del folículo, el fluido folicular es reabsorbido. Parte de este líquido puede salir a través de la lámina basal del folículo y ser tomado por vasos linfáticos. Otra parte puede filtrarse por la menor presión osmótica intrafolicular, debida a la degradación enzimática de sustancias osmóticamente activas como los glicosaminoglicanos, hialurona, condroitín / dermatán - sulfato y ADN en solución (Clarke *et al.*, 2006).

1.4.3.3 DOMINANCIA

Esta fase se caracteriza por un rápido crecimiento folicular y maduración oocitaria en el folículo dominante. Las sustancias producidas por éste son responsables de la supresión gradual en la liberación de FSH y de la inhibición de la emergencia de la siguiente onda de desarrollo folicular con inducción de atresia de los folículos restantes y es concomitante con el incremento en la secreción pulsátil de LH hipofisiaria. El diámetro del folículo dominante en bovinos puede llegar a los 15 mm en momentos previos a la ovulación (Driancourt, 2001).

Si el folículo dominante es removido (por ejemplo por punción ovárica o ablación folicular), un pico de FSH se presentará a las 12 horas, resultando en la emergencia de una nueva onda de desarrollo folicular a las 24 (Adams *et al.*, 2008).

Al igual que en el reclutamiento, la IGF-I parece ser un factor de crecimiento indispensable en la dominancia folicular. Animales con deficiencias en su Hormona de Crecimiento (GH), limitan la producción de IGF-I y esto se ha asociado a la suspensión de la dominancia folicular en

folículos de 8 mm de diámetro. Esto se debe al parecer a que la falta de IGF-I puede afectar parcialmente la producción de receptores de LH. En esta etapa, la LH puede estimular en la teca la producción de Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF), un potente estimulador de la angiogénesis. Bajo la acción de VEGF el folículo dominante garantiza el suministro de sangre que transporta las gonadotropinas necesarias para finalizar su crecimiento. En esta función también intervienen las angiopoyetinas y el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), el cual también se ha reportado como mitógeno en las células de la teca. En contraste, la producción de estradiol no parece ser un prerrequisito para la dominancia folicular (Webb *et al*, 1998; Lucy, 2007).

La unión de la LH a su receptor en las células de la teca estimula la producción de la enzima 17α Hidroxilasa (conocida también como CYP 17) la cual convierte la pregnenolona y progesterona a dihidroepiandrosterona y androstenediona, respectivamente; ambas son materias primas para la síntesis del estradiol en las células de la granulosa (Palma, 2008). En la fase de dominancia, la actividad aromatasa es regulada por la proteína 3 Beta Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (3β HSD) en células de la granulosa (Driancurt, 2001; Webb *et al*, 2004). La expresión de ARNm de 3β HSD sólo se ha encontrado en folículos mayores a 9 mm de diámetro (Webb *et al.*, 1998).

Durante la dominancia también se ha encontrado que la FSH induce incremento en la expresión génica de las células granulosas para ARN mensajero que codifica la traducción de receptores de LH, enzima de clivaje

de la cadena lateral de la p450 y para la aromatasa p450, estimulando la estereidogénesis (Lucy, 2007; Peter *et al*, 2009). La granulosa es sensible a la unión de receptores de LH en estado preovulatorio; esta unión induce la producción de receptores de progesterona PR-A y PR- B, que tiene funciones relacionadas con la luteinización. Además, el PR-A está asociado a mecanismos desencadenantes de la ovulación (Palma, 2008).

En estados preovulatorios, la LH induce la fosforilación y modificación de la conexina Cx43, lo que conduce a la interrupción de los puentes intercelulares, desaparición de las uniones gap y separación de las células granulosas del oocito. Esto facilitará el desprendimiento del cumulus oophorus en la ovulación y su expansión en etapas posteriores a ésta. En folículos antrales no ovulatorios la disminución de la Cx43 está asociada con atresia folicular. Adicionalmente, el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF), está asociado también con la disminución de las uniones gap y con síntesis de receptores de FSH, incremento en la producción de PGE2, y proliferación de las células de la teca (Palma, 2008). En el período previo a la ovulación, la teca adicionalmente incrementa los niveles de Proteína Reguladora de la Estereidogénesis Aguda (StAR), cuya función es regular el transporte del colesterol en la mitocondria, estimulando la producción de andrógenos a partir de éste (Kallen *et al.*, 1998).

El oocito produce Factor Diferenciador de Crecimiento 9 (GDF-9) y Proteína Morfogénica del Hueso 15 (BMP15) como factores paracrinós relacionados con la regulación de las funciones del cumulus y la granulosa

necesarias para la ovulación y la fertilización en ratones y bovinos (Sirard *et al.*, 2007).

En condiciones normales, el folículo de mayor diámetro de la cohorte, en ausencia de cuerpo lúteo y ante un pico preovulatorio de producción de LH es el seleccionado para la ovulación, la cual se da cuando el folículo tiene entre 17 y 20 mm de diámetro (Driancourt, 2001; Moore *et al.*, 2006; Ptaszynska, 2008).

En el caso de que exista un cuerpo lúteo, los niveles circulantes de progesterona harán un bloqueo del centro de picos hipotalámico, disminuyendo la producción de LH y consecuentemente induciendo la atresia del folículo dominante. La disminución de los niveles de hormonas depresoras de la actividad FSH (estrógenos, inhibina, folistatina) posibilitarán un nuevo pico de FSH que inducirá la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular. Desde el momento de la formación del antro folicular, se reactiva el proceso meiótico del oocito. La principal sustancia involucrada en la detención de la meiosis son los altos niveles de Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc) en el oolema, cuando el AMPc disminuye prosigue el proceso meiótico oocitario, detenido en profase I desde la fase embrionaria del individuo. Si el AMPc disminuye por menor producción en el oocito, o por deterioro de los puentes celulares de la zona pelúcida provenientes de la granulosa, es un asunto pendiente de esclarecer (Sirard *et al.*, 2007; Palma, 2008).

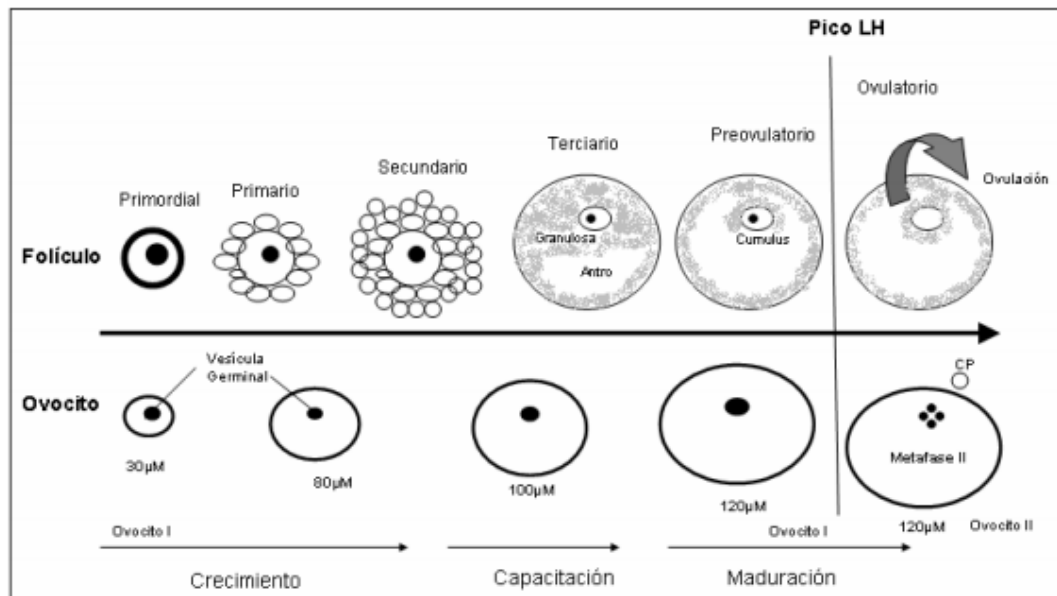


Figura 1. 2: Desarrollo paralelo del folículo y ovocito

FUENTE: (Palma, 2008)

1.5 OVOGÉNESIS

En los mamíferos, las ovogonias son células diploides que se producen a partir de las células germinales primordiales durante las primeras etapas del desarrollo fetal, las ovogonias se multiplican por división mitótica, para formar el ovocito primario que entra a la primera división meiótica (Pliego, 2005) y se detiene en la etapa de diploteno de la primera profase meiótica (Tsafirri y Dekel, 2011). El ovocito primario está rodeado por una capa de células planas que forman un folículo primario que permanece inactivo hasta la pubertad.

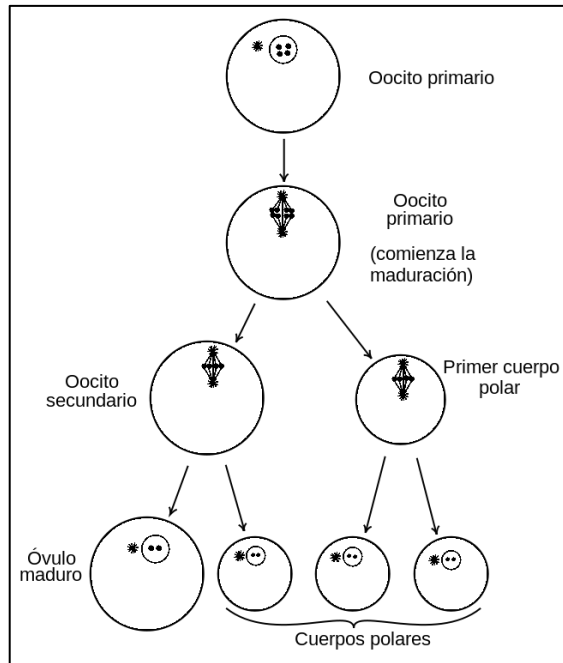


Figura 1. 3: Proceso de ovogénesis

FUENTE: (Vandyke y Gray, 1918)

1.5.1 CARACTERÍSTICAS DEL OVOCITO BOVINO

En el bovino, el ovocito es una célula grande y esférica. Un ovocito maduro es aquel que se libera en la ovulación; se caracteriza porque muestra el primer cuerpo polar en el espacio perivitelino y es una célula que se encuentra detenida en la metafase de su segunda división meiótica, es decir en metafase II (MII). Es la célula aislada más grande del organismo. La relación superficie/volumen es $\frac{3}{4}$ del radio, es decir, a mayor radio la relación de la superficie de la membrana celular respecto a su volumen es menor. Células con mayor volumen contienen más agua y, proporcionalmente, menos superficie para que ésta salga y para que entren las sustancias crioprotectoras penetrantes (Magistrini y Szollosi, 1980).

Otra característica del ovocito en MII es que los componentes subcelulares son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura osmolaridad e iones (Mc Williams *et al.*, 1995).

En el ovocito en MII, los cromosomas y los microtúbulos del huso están libres en el citoplasma, y las vesículas con los gránulos corticales están localizadas próximas a la membrana plasmática u ovolema. El huso meiótico se forma por polimerización de la proteína denominada tubulina cuando alcanza una concentración crítica. La polimerización de la tubulina da lugar a los microtúbulos que constituyen el huso (Marina *et al.*, 2002). Los ovocitos maduros presentan una gran heterogeneidad en la distribución y organización de los organelos citoplasmáticos y en la permeabilidad de la membrana al agua (Fabbri *et al.*, 2000). Están rodeados por las células de la corona y más externamente por las células granulosas del *cumulus* (Hafez *et al.*, 1996).

El ovocito inmaduro, con vesícula germinal visible, es decir, en profase I (PI), tiene los cromosomas condensados y localizados dentro del núcleo o vesícula germinal. Están protegidos por la membrana nuclear a diferencia de los cromosomas del ovocito en MII. En el ovocito inmaduro no se ha formado el huso meiótico. La congelación de ovocitos en PI previene la alteración del huso y la aneuploidía (Eroglu *et al.*, 1988).

1.5.1.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÚMULOS

El cúmulo está formado por varios miles de células de la granulosa formando una compleja matriz extracelular. El mayor componente de esta matriz es el ácido hialurónico, un polímero ramificado (1,4 ácido glucurónico: 1,3 acetilglucosamida). Los componentes proteicos, incluyen elementos comunes en muchas matrices extracelulares como colágena, laminina, fibronectina, tenacina-C. El ácido hialurónico está fusionado a las proteínas de unión al ácido hialurónico, CD44 y posiblemente a la fibronectina asociada a las integrinas de superficie en las CC. La CD44 y las integrinas pueden iniciar el proceso de traducción de señales por unión y activación de una amplia gama de regulaciones intracelulares o proteínas de andamio. Alguna alteración de la matriz puede regular la fisiología de las CC (Floman y Ducibella, 2006).

La comunicación entre las CC y el ovocito es fundamental durante la maduración, por la generación de una señal positiva de las CC en respuesta a los factores producidos por el ovocito para estimular la ruptura de la VG y completar la maduración nuclear del ovocito. Además, la presencia de las CC durante la maduración ayuda al ovocito para que tenga la habilidad de formar el pronúcleo masculino después de la fertilización (Shirazi *et al.*, 2007).

1.5.1.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA

La ZP es una matriz extracelular especializada que es sintetizada y secretada por el ovocito en crecimiento de los mamíferos, está compuesta de 3 a 4 glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Florman y ducibella, 2006; Joo Yi y sutousky, 2011).

Todas las proteínas de la ZP tienen modificaciones postraduccionales de glicosilación de serina/treonina (en las uniones-O) y de asparagina (en las uniones-N) de tal manera que las cuatro proteínas forman una red que rodea al ovocito con varios micrómetros de grosor (Florman y Ducibella, 2006). En el modelo del ratón están ensambladas de tal manera, que las fibras heterodiméricas (ZP2–ZP3) están unidas con la ZP1 y la ZP3 que tienen la función de ser el receptor primario para la unión del espermatozoide (Senger, 2003; Joo yi y Sutousky, 2011).

Las funciones principales de la ZP son: regular la unión de los espermatozoides con el ovocito, inducir la reacción acrosomal en el espermatozoide, impedir el paso de espermatozoides adicionales en un ovocito fertilizado y asegura la integridad del embrión a medida que atraviesa el oviducto y parte del útero (Wassarman, 2008).

1.5.2 MADURACIÓN DE OVOCITOS

La maduración de un ovocito abarca dos aspectos: la maduración nuclear y la maduración citoplasmática. Se considera que el ovocito alcanza la madurez nuclear cuando se encuentra en la metafase de la segunda división meiótica (MII). Durante la vida fetal o poco antes del nacimiento los ovocitos se detienen en la primera división meiótica que se

caracteriza por un gran núcleo conocido por vesícula germinal (VG). Los ovocitos permanecen en el estado de VG hasta la pubertad. Durante cada ciclo reproductivo un número de ovocitos reinician la meiosis, que se manifiesta por la ruptura de la VG. Estos ovocitos completan la primera división meiótica con la extrusión del primer cuerpo polar, y sin pasar por un proceso de interfase, se detiene en la MII. Cuando el ovocito maduro es fertilizado completa la segunda meiosis y por expulsión del segundo cuerpo polar se convierte en una célula haploide (Tsafirri y Dekel, 2011).

Durante la maduración citoplasmática se llevan a cabo procesos celulares como la acumulación de RNAm, proteínas, sustratos y nutrientes (Watson, 2007); también se llevan a cabo modificaciones post-traduccionales de proteínas y cambios ultraestructurales del citoplasma que son necesarios para que el ovocito pueda ser competente para llevar cabo el desarrollo embrionario (Krisher, 2004).

Durante el crecimiento del ovocito se activan varios genes; y de las proteínas que se generan, algunas actúan directamente en la maduración del ovocito, como el factor promotor de la maduración que está involucrado en el progreso de la meiosis y control del ciclo celular. Otros genes que se transcriben pueden estar involucrados en procesos celulares fundamentales para el desarrollo antes y después de la activación del genoma del cigoto. La LH ayuda a completar la maduración meiótica e induce cambios importantes en el citoplasma de los ovocitos de los mamíferos como la secreción de los gránulos corticales y la formación de pronúcleos (Florman y Ducibella, 2006).

1.5.3 MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE OVOCITOS

Los ovarios contienen un elevado número de folículos que se encuentran en diferentes estados de desarrollo (primordiales, en crecimiento, atrésicos), de los cuales, solamente una pequeña proporción va a ser utilizada durante la vida reproductiva del animal. La recolección de ovocitos permite recuperar y aprovechar folículos no ovulatorios, que bajo condiciones fisiológicas se volverían atrésicos, con el fin de aprovechar al máximo el potencial genético de una donadora, usando procedimientos *in vitro* (Gordon y Lu, 1990).

Existen dos formas de obtener ovocitos bovinos: 1) de animales vivos, y 2) de animales muertos. La recolección de ovocitos de animales vivos (hembras jóvenes, vacas productoras de leche o de carne) permite incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora por año, obtenidos por procedimientos *in vitro*; además, permite la disminución del intervalo generacional y ayuda a establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia productiva (Galli *et al.*, 2001).

Dentro de las técnicas existentes para la recolección de ovocitos de hembras vivas, se encuentran la laparotomía-laparoscopia y la aspiración transvaginal guiada por ultrasonido. El desarrollo de la laparoscopia ha permitido avances en el diagnóstico y manejo de la fertilidad para incrementar la producción animal. Se ha utilizado para desarrollar la industria de transferencia en aquellas especies o grupos de edades en

donde no es fácil realizar la manipulación del tracto reproductivo por vía rectal durante la recuperación de ovocitos y/o transferencia de embriones.

Dentro de las ventajas que ofrece la laparoscopia se encuentra el bajo costo del equipo, la obtención de una imagen clara y un mejor control de problemas de recuperación pos quirúrgico del ovario (Tervit, 1996).

Sin embargo, esta técnica tiene como desventajas la no visualización del cohorte de folículos que están en crecimiento debajo de la superficie ovárica, el desconocimiento de los efectos a largo plazo de recolecciones repetidas que pueden llegar a formar cicatrices y adherencias en el sitio de operación y, básicamente, el hecho de ser una técnica altamente invasiva, por lo cual no es aceptada desde el punto de vista de bienestar del individuo (Tervit, 1996).

La aspiración transvaginal guiada por ultrasonido Ovum Pick-Up (OPU) es la técnica de recolección de ovocitos de hembras vivas usada regularmente. La aspiración folicular puede ser repetida en el mismo animal durante 5 a 6 meses, y con una periodicidad de dos aspiraciones por semana o una semanal, sin ningún efecto adverso sobre la reproducción o sobre el bienestar del animal (kruip *et al.*, 1994).

Además, la OPU se puede aplicar durante los primeros tres meses de gravidez a novillas o vacas y a novillonas prepúberes, con lo que se logra hacer mas corto el intervalo generacional (Kruip *et al.*, 1993).

La OPU-FIV permite obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad o mala respuesta a los tratamientos superovulatorios (Looney *et al.*, 1994).

Se ha demostrado que al final del período de aspiraciones los animales pueden retornar a sus ciclos estrales normales y ser incorporados a programas de cría (Kruip *et al.*, 1994).

La viabilidad de los embriones producidos a partir de ovocitos obtenidos por aspiración es similar a la alcanzada por embriones producidos por otros procedimientos *in vitro*, pero un poco más baja que la obtenida para embriones producidos por lavado, obteniéndose porcentajes de preñez que varían desde un 25 % hasta un 45% (kruip *et al.*, 1994).

Para realizar la aspiración transvaginal, las hembras son sedadas. El recto es relajado con Detomidina (0.016 mg/Kg IV), y se aplica anestesia epidural para prevenir las contracciones abdominales y facilitar la manipulación de los ovarios. Se vacía el recto y se limpia la región perineal. Para la técnica se utiliza un transductor de 5 ó 7.5 MHz que posee una aguja en la parte superior con punta ecogénica, y que es conectado a una bomba peristáltica de vacío e introducido por vía vaginal. Se hace manipulación rectal de los ovarios y se colocan contra el transductor, se visualizan los folículos (mayores de 2 mm) y, una vez localizados, la aguja atraviesa la pared vaginal y se recoge el aspirado folicular en tubos con medio de cultivo en cada pasaje de la aguja se hace punción solamente un folículo (Carolan *et al.*, 1994).

Las ventajas de esta técnica de recolección son su fácil utilización a nivel de campo, el menor riesgo para el paciente y su menor invasividad, comparada con la laparoscopia. Sin embargo, entre sus desventajas se

encuentra el relativo elevado costo del equipo y la necesidad de personal capacitado para realizar la punción (kruip *et al.*, 1994).

Por otro lado, la obtención de ovocitos de animales muertos se hace mediante la recolección de ovarios de vacas sacrificadas en rastro. Esta técnica suministra una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo, provenientes de animales en diferentes estados del ciclo estral, que pueden ser madurados, criopreservados, fertilizados y cultivados in vitro hasta alcanzar estados avanzados de desarrollo embrionario (Gordon y Lu, 1990).

Se deben evaluar los factores externos que están involucrados en la manipulación de los ovocitos antes de realizar el cultivo in vitro, ya que pueden afectar la capacidad de los ovocitos para lograr un buen desarrollo, reflejado en una adecuada fertilización y división embrionaria (Merton *et al.*, 2003).

Dentro de los factores externos que están relacionados con la manipulación de los ovarios, se encuentran la temperatura de almacenamiento de los ovarios y el tiempo de recolección de los ovocitos después del sacrificio. La temperatura a la cual se deben transportar los ovarios desde el rastro hasta el laboratorio oscila entre 35 y 37 °C. Temperaturas inferiores a los 30 °C durante el almacenamiento de los ovarios producen pérdida de los productos de transcripción y lesión de los organelos a nivel citoplasmático, los cuales van a ser mediadores importantes del desarrollo embrionario temprano (Sekine *et al.*, 1992).

El tiempo de recolección de los ovocitos de los ovarios igualmente influye en la competencia de desarrollo. Gordon y Lu (1990) reportan que los ovarios pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30 a 37 °C durante 8 h sin afectar la calidad de los ovocitos para los procesos de maduración y fertilización in vitro.

La recolección de ovocitos provenientes de ovarios obtenidos en rastro se puede hacer por medio de dos métodos: el corte de ovarios y la aspiración con jeringa de folículos superficiales mayores de 2 mm de diámetro (Seneda *et al.*, 2001).

Los ovarios se transportan al laboratorio en solución salina adicionada con antibióticos (penicilina y estreptomina), a temperatura de 35 a 37 °C. En el laboratorio, se remueve el tejido adyacente, el cuerpo lúteo y la sangre mediante lavados con solución salina (Gordon y Lu, 1990).

El método de corte consiste en colocar cada uno de los ovarios en cajas de Petri que contienen medio de recolección de ovocitos, y cortar la superficie y el interior de los ovarios a lo largo y a través de éstos con un bisturí, haciendo cortes separados a 2 mm de distancia aproximadamente (Seneda *et al.*, 2001).

En el caso de la aspiración de ovocitos con jeringa, los folículos ováricos superficiales visibles de 2 a 7 mm de diámetro son aspirados con jeringa de 5 o 10 ml y aguja hipodérmica estéril calibre 18, posteriormente el líquido folicular es depositado en cajas de Petri para realizar la búsqueda de los ovocitos aspirados (Lonergan *et al.*, 1991).

Seneda y colaboradores (2001) Compararon los métodos de corte de ovarios y de aspiración de folículos para evaluar el número de ovocitos recuperados por ovario y la calidad de éstos. Demostraron que por el método de corte se obtiene una mayor cantidad de ovocitos, así como ovocitos de mejor calidad para estudios de fertilización in vitro, en comparación con el número de ovocitos recuperados mediante la aspiración folicular.

La disminución en las tasas de recuperación y producción de embriones en el caso de aspiración folicular puede estar asociada a efectos nocivos sobre las capas de las células del cumulus ejercidos por la fuerza de aspiración (Hamano y Kuwayama, 1993).

Por otra parte, el mayor número de ovocitos obtenidos por el método de corte puede estar explicado por la recuperación de ovocitos provenientes de folículos menores de 2 mm de diámetro que están en el interior del folículo (Hamano y Kuwayama, 1993).

Sin embargo, Arlotto y colaboradores (1996) sostienen que estos ovocitos tienen poco potencial para sufrir maduración meiótica y desarrollo embrionario, comparado con los ovocitos recuperados de los folículos presentes en la superficie del ovario, ya que los ovocitos de folículos internos pueden no haber adquirido aún la competencia para la maduración y desarrollo

1.5.4 CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS

Una etapa crítica en el procedimiento de fertilización in vitro (FIV) es la elección de ovocitos de buena calidad para poder garantizar una óptima sobrevivencia. Por esto, es preferible congelar los mejores óvulos disponibles. Los 4 aspectos más importantes que evalúan la calidad del óvulo son: estadio nuclear, características citoplasmáticas, aspecto de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cumulus (Chen, 1986).

Existe controversia en cuanto si se mantiene o no el cumulus para mejorar las tasas de sobrevivencia de acuerdo con Chen (1986), su ausencia facilita la introducción de la sustancia crioprotectora en el citoplasma, tanto es así, que el primer embarazo de este tipo en humanos fue producto de la congelación de un óvulo sin cumulus.

También Gook y colaboradores (1993) reportaron una tasa de sobrevivencia mayor en ovocitos congelados sin cumulus en comparación con los que mantenían las células de la granulosa intactas (69 vs. 48%). Pero existen estudios que demuestran la importancia de conservar el cumulus para garantizar una mayor sobrevivencia en los ovocitos al final del proceso de criopreservación. Al parecer, la presencia de las células de la granulosa sirve como un escudo contra las modificaciones osmóticas repentinas y el estrés ocasionado por la concentración y dilución de los crioprotectores durante el proceso de equilibrio y remoción de éstos después del descongelamiento (Imoedmhe y Sigue, 1992).

El primer método para discriminar entre ovocitos competentes e incompetentes para el desarrollo embrionario es la morfología del citoplasma y de las células del cumulus. La calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que éste posee para la maduración y fertilización *in vitro* (Leibfried *et al.*, 1989).

Las células del cumulus son subpoblaciones de células de la granulosa que proveen de nutrientes al ovocito durante su crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida, y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización (Arlotto *et al.*, 1996).

Los ovocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del cumulus y la apariencia del citoplasma. El tipo A corresponde a un ovocito con células del cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cumulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C se caracteriza por poseer un cumulus denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras; el tipo D tiene un cumulus con células expandidas y un citoplasma irregular con zonas oscuras (Lonergan *et al.*, 1991).

1.6 CRIOCONSERVACIÓN

La congelación de células vivas es un proceso fisicoquímico complejo de transporte de calor y agua entre la célula y el medio que la rodea. Tanto la criopreservación de ovocitos como la de embriones se lleva a cabo mediante la exposición de ambos a temperaturas muy bajas. Con el enfriamiento se produce una disminución notable del metabolismo y ahorro energético, que son factores necesarios para la prolongación de la vida celular (Vila, 1984).

La criopreservación de material biológico tiene lugar usualmente en una solución acuosa, con diferentes solutos presentes. Las propiedades fisicoquímicas que rigen los eventos a los cuales está sometida la solución durante la congelación derivan de la concentración de solutos disueltos en ella. El punto de congelación de la solución es inversamente proporcional a la concentración de solutos presentes (Vila, 1984).

Cuando la suspensión celular es enfriada y alcanza una temperatura entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que darán lugar a regiones en fase cristalina. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida intracelular gracias a la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento de cristales dentro de la célula cuando en el medio extracelular ocurre la cristalización se forma hielo puro dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida, a medida que el cambio de fase progresa. Así, las células en suspensión deben

deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico (Vila y García, 1983).

Existe una tasa de congelación óptima para cada tipo de célula debido a las diferencias de permeabilidad del agua, el coeficiente de temperatura de dicha permeabilidad y su relación superficie-volumen (Leibo, 1986).

Con una velocidad de enfriamiento adecuada, la célula se deshidrata y concentra intracelularmente antes de alcanzar la cristalización, de tal forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimiza (Mazur, 1984).

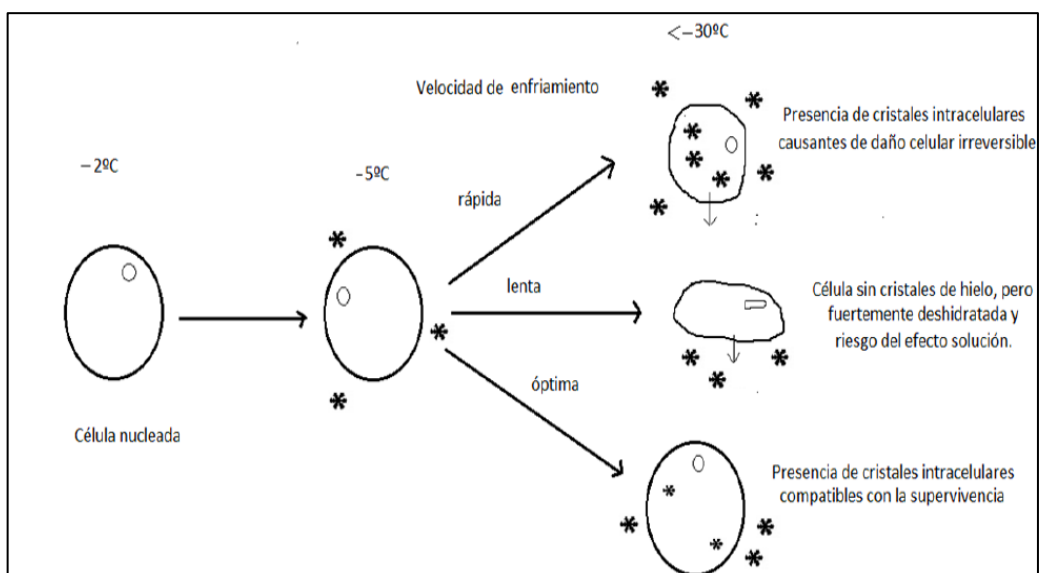


Figura 1. 4: Modificaciones físicas de la célula en función de la velocidad de enfriamiento

FUENTE:(Guyader, 1998)

1.6.1 AGENTES CRIOPROTECTORES (ACP)

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de muy baja toxicidad, utilizadas para proteger células y tejidos del daño que se ocasiona durante el proceso de congelación y descongelación. Disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (disminuyen la temperatura durante

la transición del agua de líquido a sólido). Estos también actúan estableciendo puentes de hidrógeno con otras moléculas biológicas, lo que hace que no pierdan su estructura fisiológica original y por lo tanto su viabilidad (Bajo y Coreleu, 2009).

Bioquímicamente se pueden distinguir tres tipos de crioprotectores (CP): los alcoholes (etanol, metanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa y sacarosa) y el dimetil sulfóxido (García, 1984).

Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, según tengan o no, la capacidad de atravesar la membrana celular (Celestino y Gatica, 2002).

1.6.1.1 CRIOPROTECTORES PENETRANTES

Los crioprotectores penetrantes son de bajo peso molecular y permeable, los cuáles son capaces de atravesar la membrana celular de forma activa o pasiva (Shaw *et al.*, 1995). Entre éstos se encuentran el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, polietilenglicol, 1-2 propanediol y el etilenglicol (EG); todos estos compuestos deshidratan a la célula penetrándola para ayudar a proteger el citoplasma (Albarracin, 2005; Mucci *et al.*, 1992; Diez *et al.*, 2012). De los crioprotectores mencionados anteriormente el más utilizado en vitrificación de embriones es el etilenglicol, debido a su baja toxicidad (Kasai *et al.*, 1992) y a su rápida difusión a través de la membrana plasmática (Emiliani *et al.*, 2000).

1.6.1.2 CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación. Son importantes porque ejercen su acción protectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen asociarlos a los agentes penetrantes. Las más utilizadas son: dextrosa, dextrano, sacarosa y glucosa. Estos compuestos son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de ésta a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (Kuleshova *et al.*, 1999).

1.6.2 MÉTODO DE CONGELACIÓN LENTA

Para cada célula hay un ritmo óptimo de enfriamiento. El ritmo de congelación condiciona el ritmo de descongelación. El uso de crioprotectores hace que el agua salga a través de la membrana plasmática y se congela fuera de la célula, por lo tanto, la célula se deshidrata. Esto sucede por la mayor presión osmótica extracelular que el agua en su salida de la célula tiende a equilibrar. El tiempo en el que se expone el ovocito al crioprotector es de 10 a 30 min de duración lo cual permitirá una deshidratación adecuada (Nieman, 1991).

La deshidratación del ovocito reduce el riesgo de formación de cristales de hielo intracelulares que son nocivos para las células. Si el descenso térmico es demasiado rápido, no hay tiempo suficiente para que salga el agua necesaria del ovocito y se formarán cristales de hielo dentro de la célula (Friedler *et al.*, 1988).

Los rangos de congelación más usuales consisten en un descenso de temperatura a un ritmo de 0.3- 0.5 °C / minuto desde el momento en que comienza la formación de hielo, que suele ser entre los -5 y -9 °C, hasta llegar a temperaturas de -33, -40 °C, y posteriormente pasar ya directamente al nitrógeno líquido (Shaw *et al.*, 2000).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que a una temperatura entre -5 y -9 °C puede haber un sobreenfriamiento en la pajilla con lo que se formarán cristales de hielo en el interior de la célula, dañando de esta manera sus organelos. Con la finalidad de evitar la formación intracelular de cristales de hielo se realiza el *seeding*, el cual consiste en que, una vez estabilizada durante 5 min la pajilla a una temperatura entre -5 y -9 °C, se toca su pared con un objeto enfriado a -196 °C y de este modo se cristaliza el líquido extracelular de manera controlada (Maurer, 1978).

1.6.2.1 CAMBIOS DEL OVOCITO DURANTE LA CONGELACIÓN

El agua es el disolvente universal de los seres vivos, el agua pura tiene un punto de equilibrio de congelación a 0 °C. Los solutos a las concentraciones que se dan en el organismo disminuyen el punto de congelación en unos grados. Cuando una célula es enfriada a temperatura por debajo de su punto de equilibrio de congelación, se forma hielo que puede dañar o matar a la célula (Mazur *et al.*, 1984).

El ovocito que se congela demasiado rápido sufre la formación de cristales de hielo en su citoplasma que pueden dañar los organelos. La congelación demasiado lenta produce al deshidratarse un aumento en la concentración de solutos nociva para el ovocito existe además el riesgo de daño debido al descenso térmico (Mazur *et al.*, 1992).

Los momentos más críticos de la sobrevivencia celular son la fase inicial de congelamiento a la temperatura baja y su retorno definitivo a condiciones fisiológicas. Al llegar a la temperatura del N₂L (-196°C), el almacenamiento por largos períodos de tiempo no tiene efecto en la tasa de sobrevivencia del gameto congelado (Zhu *et al.*, 1990).

La facilidad del paso de agua y sustancias crioprotectoras a través de la membrana plasmática es el principal factor que controla los efectos de la congelación, la cual depende de la composición de ésta, de su permeabilidad en función de la temperatura ya que con temperaturas semejantes a la corporal el paso de agua hacia el exterior de las células es más fácil que cuando se da en temperaturas bajas (Mazur y Shneider, 1986); de la relación superficie/volumen, esto se debe a que una superficie pequeña de la membrana de una célula da menor espacio para que exista un adecuado paso de agua al exterior de la célula o entrada del crioprotector cuando se utilizan crioprotectores penetrantes (Leibo, 1980) y de la diferencia de presión osmótica a los dos lados del ovolema (Shaw *et al.*, 1993).

Entre algunos problemas asociados a la congelación tenemos: el posible efecto de la integridad de las fibras del huso (Pickering y Jhonson, 1987) y los gránulos corticales (Vincent y Johnson, 1992), la despolimerización de los microtúbulos del huso puede inducir aneuploidías (Bouquet *et al.*, 1993), el daño en la zona pelúcida (Van Blerkom y Davis, 1994), facilita la polispermia, la zona pelúcida se vuelve más dura y se reduce la tasa de fertilización (Dumoulin *et al.*, 1994).

Conocer la tolerancia límite a las variaciones osmóticas y del volumen ovocitario (se arruga al deshidratarse y se hincha al rehidratarse) ayudará a utilizar sustancias crioprotectoras a una concentración óptima (Pedro *et al.*, 1997). Los cambios de volumen del ovocito no deben sobrepasar en $\pm 30\%$ (Newton *et al.*, 1999).

Los ovocitos al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales de hielo que lesionan sus estructuras citoplasmáticas (Mazur *et al.*, 1984). Cuando se congelan ovocitos, los crioprotectores no penetrantes, que se mantienen extracelularmente, aumentan la concentración extracelular de solutos y por tanto, aumentan la presión osmótica extracelular en relación con la presión osmótica intracelular. Este desnivel osmótico induce la salida del agua intracelular al exterior, el ovocito se deshidrata y la alta concentración de solutos extracelulares se diluye hasta que el agua extracelular se congela y se vuelve metabólicamente inactiva (Shaw, 1993).

La célula se arruga, disminuye su volumen y el riesgo de formación de cristales de hielo intracelular se reduce. Las sustancias crioprotectoras pueden tener efectos adversos sobre el ovocito en función de la temperatura, concentración y tiempo de exposición. Si estos parámetros no se ajustan de manera apropiada se producirán cambios en el volumen del ovocito, lo podrán dañar o quedará más sensible al descenso térmico (Fahy, 1986).

II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 UBICACIÓN

2.1.1 Trabajo de campo

REGIÓN: Ayacucho 2800 m.s.n.m

PROVINCIA: Huamanga

DISTRITO: Carmen Alto

LUGAR: Matadero de la Comunidad de “Quicapata”

2.1.2 Trabajo de laboratorio

REGIÓN: Ayacucho 2750 m.s.n.m

PROVINCIA: Huamanga

DISTRITO: Ayacucho

LUGAR: Laboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

2.2 DURACIÓN

Tiempo de ejecución	: 6 meses
Fecha de inicio	: abril del 2016
Fecha de término	: setiembre del 2016

2.3 TAMAÑO DE MUESTRA

La población fue constituida por ovocitos obtenidos de 192 ovarios en 96 vacas criollas del “Matadero de Quicapata”. La unidad de muestreo fueron los ovocitos de calidad A y B seleccionados según (Capítulo II 2.5 – d), 150 ovocitos de diámetros D1, D2 y 50 del D3 haciendo un total de 350 ovocitos.

2.4 MATERIALES

2.4.1 Material de laboratorio

- 01 Termo con termómetro
- 01 Micropipeta de 10 ul, 20 ul y 1000 ul
- Puntas para micropipeta (blancas, amarillas y azules)
- 01 Jeringa cargador de pajillas
- 01 Bolsa de placa petri de 100 ml (cuadriculadas)
- 01 Bolsa de placas petri de 35 ml
- 01 Bolsa de placa petri de 5 pocillos con tapa
- 01 Paquete de pajuelas a de 0.25 ml
- 01 Bolsa de sellador de pajueta
- 01 Pinza para pajuelas de 0.25 ml
- 01 Cortador de pajuelas
- 01 Pinza hemostática

- 01 Rollo de algodón
- Vasos precipitados de 100 y 250 ml

2.4.2 Reactivos y Medios

- Solución salina 0.9%
- Gentamicina
- Alcohol al 70%
- Etilenglicol + sucrosa
- Tinción azul de tripán
- Medio de manipulación
- Nitrógeno líquido

2.4.3 Equipos y aparatos

- 01 Tanque de nitrógeno de 3kg
- 01 Congelador de embriones Freeze Control Cryologyc CL 5500®
- 01 Estereoscopio Nikon®
- 01 Microscopio Accu-Scope®
- 01 Platina térmica Minitube®
- 01 Regla milimétrica
- 01 Baño María Kendal Gemmyco®

2.4.4 Otros

- 01 Caja guantes de látex talla XS
- 01 Caja de jeringas de 10 ml
- 01 Bolsa de tubos falcon de 15 ml

- Agujas N° 18
- 01 Bolsa de pipetas pasteur desechable
- Rollos de gasa
- 01 Guardapolvo blanco
- Cuaderno de apuntes

2.5 PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

a. Preparación de las soluciones de trabajo

- Medio de transporte solución salina al 0.9 %, para 1 litro se agregó 90 gr de NaCl + 100 ul de Gentamicina enrazó con agua destilada (Sirard y First, 1988; Weimer *et al*, 1991; Madison *et al*, 1992; Fry *et al*, 1997).
- Medio de manipulación para 40 ml, 2 % de SFB (0.8 ml) y se enrazó con PBS.

b. Recolección del material biológico

- Se obtuvieron ovarios del matadero procedentes de hembras bovinas criollas de diferentes edades y condiciones fisiológicas estos ovarios presentaban en su superficie una cantidad variable de estructuras: folículos, cuerpos lúteos, hemorrágicos y albicans (Machatkova *et al.*, 1996).
- Las muestras recolectados fueron transportados al laboratorio en solución salina al 0.9%, a temperatura 37°C.
- El laboratorio estuvo aséptico y con los equipos preparados, previamente al ingreso de las muestras, se limpió y desinfectó las

superficies de trabajo con alcohol al 70° y se verificó que estén todos los materiales necesarios.



Foto 2. 1: Recolección de ovarios en la zona de evisceración Matadero de Quicapata-Ayacucho

FUENTE: PROPIA

c. Aspiración de ovocitos

- Se lavó los ovarios con solución salina al 0.9 % a 37 °C.
- Se colocaron los ovarios en un vaso precipitado a baño María a 37°C.
- Se secó con gasa estéril la superficie del ovario.
- Se aspiró diámetros folículos **D1** ($\geq 1 < 3$ mm), **D2** ($\geq 3 < 5$ mm) y **D3** ($\geq 5 < 7$ mm) medidas con una regla milimétrica.
- Sin embargo se excluyó folículos degenerados o atrésicos según características morfológicas.
- La aspiración se realizó con una jeringa de 10 ml con aguja hipodérmica calibre 18 y el líquido folicular fue depositado en tubos falcon a baño María 37° C (Kathryn y John, 1999).
- Se dejó sedimentar por 5 minutos y depositó el sedimento en una

placa petri con medio de manipulación (PBS+SF 2%) para realizar la búsqueda de los ovocitos al estereoscopio Nikon® a 1.5 x.



Foto 2. 2: Proceso de aspiración y búsqueda de ovocitos

FUENTE: PROPIA

d. Selección y clasificación de ovocitos

- Seguidamente se efectuó la búsqueda en el estereoscopio Nikon® (Anexo 13) con una micropipeta de 10 ul.
- Se clasificaron los ovocitos según Leibfried y First, (1979) y Fry., *et al* (1997), seleccionando sólo aquellos de calidad A y B.

Calidad A: ovocito rodeada por más de tres capas compactas de células del cúmulus, citoplasma finamente granular dando una apariencia compacta y una zona pelúcida integra.

Calidad B: ovocito rodeado parcialmente de dos o más capas de células del cúmulus, citoplasma se encuentran con algunos cuerpos pigmentados y la zona pelúcida integra.

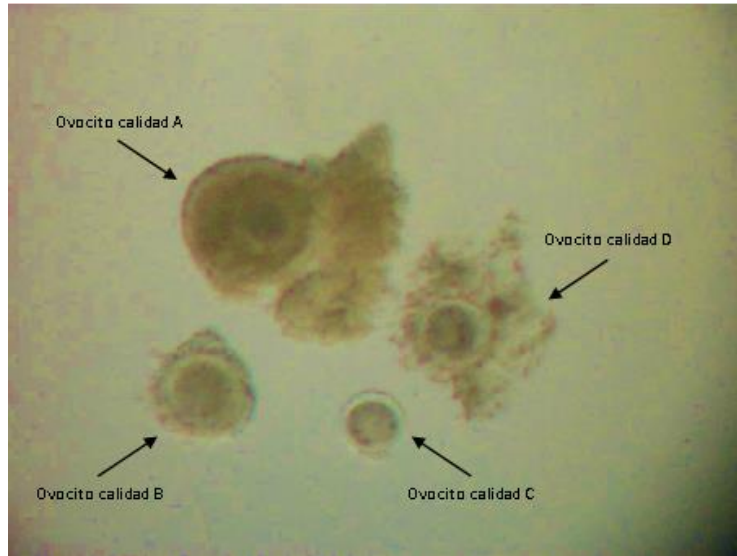


Foto 2. 3: Clasificación de ovocitos antes de la congelación

FUENTE: PROPIA

- Los ovocitos seleccionados fueron lavados en gotas de medio de manipulación (PBS+SF 2%) dos veces para luego ser congelados.

e. Congelación de ovocitos

- Se realizó de acuerdo a un protocolo modificado de Voelkel y Hu, (1992):
 - Se expuso los ovocitos a una solución comercial Bovifreeze® (Etilenglicol +Sucrosa) durante 10 minutos.
 - Luego los ovocitos fueron envasados en pajuelas de 0.25 ml.
 - Seguidamente se colocaron en el equipo de congelación Freeze Control CL 5500 Cryologyc® (Anexo 14) a una temperatura de inicio de -6 °C.
 - El *seeding* (Maurer, 1978) se indujo a los 2 minutos de estabilización a -6 °C con ayuda de una pinza metálica enfriada en NL₂.

- Luego se congelaron automáticamente a una tasa de 0.5 °C/min hasta los -32 °C.
- Finalmente, se sumergieron en nitrógeno líquido (Lehnjensen y Greve, 1982).



Foto 2. 4: Lavado de ovocitos, aspiración a crioprotector y realización de seeding

FUENTE: PROPIA

f. **Descongelación de ovocitos**

- La descongelación se realizó a las 24 horas exponiendo las pajuelas a la intemperie por 5 segundos para luego sumergirlas en baño María a 30 o 35 °C durante 20-30 segundos (Vajta *et al.*, 1998).
- Luego se colocaron en un plato petri que contenga gotas de medio de manipulación y fueron lavados dos veces.
- Se colocaron en placas de 5 posillos para su tinción con azul de tripán al 0.05% por dos minutos (Gupta *et al.*, 2002).

- Finalmente se realizó un lavado en gotas de medio de manipulación y evaluó la viabilidad morfológica al microscopio Accu-Scope® (Anexo 12) a 40 x.

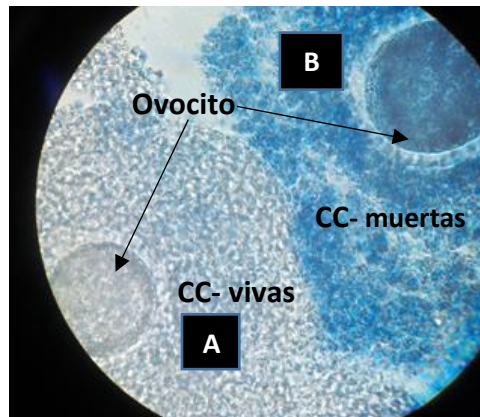


Foto 2. 5: Criterios de evaluación de la viabilidad de las CC. En A las células incoloras se consideraron como vivas y en B las teñidas se consideraron como muertas.

FUENTE: PROPIA

- Para una mejor evaluación estos fueron clasificados en excelente, bueno, regular y malo según los siguiente criterios:
 - ❖ **Excelente:** citoplasma, células del cúmulus y zona pelúcida intactas sin teñir.
 - ❖ **Bueno:** citoplasma, zona pelúcida intactas sin teñir y células del cúmulus intactas parcialmente teñidas.
 - ❖ **Regular:** citoplasma, zona pelúcida intactas parcialmente teñidas y células del cúmulus intactas o dañadas totalmente teñidas.
 - ❖ **Malo:** citoplasma y zona pelúcida dañadas, pérdida total de las células del cúmulus y estructuras totalmente teñidas.

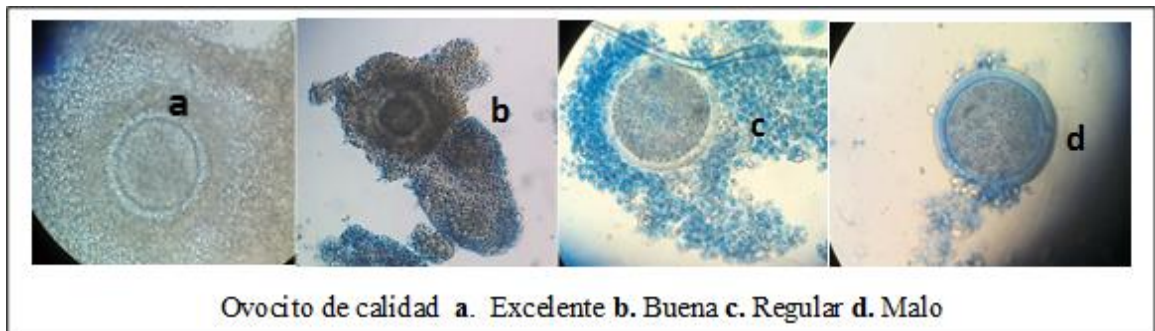


Foto 2. 6: Clasificación de ovocitos post descongelación en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho – 2016

2.6 VARIABLES EN ESTUDIO

- **Variable independiente:**
 - ✓ Diámetro folicular
- **Variable dependiente:**
 - ✓ Viabilidad de ovocito post descongelación

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existe diferencia entre tres parámetros de diámetro folicular con relación a la viabilidad de ovocitos post descongelación, se usó una prueba Chi cuadrada del programa R® versión 3.3.1 (2016-06-21).

$$x^2 = \sum \frac{(o - e)^2}{e}$$

Donde:

O: observados

E: esperados

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RECUPERACIÓN DE OVOCITOS

Tabla 3. 1: Promedio de ovocitos recuperados por animal y ovario en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016

Nº DE ANIMALES	Nº DE OVARIOS	Nº TOTAL DE OVOCITOS	PROMEDIO OVOCITOS POR ANIMAL (PROM ± DE)	PROMEDIO OVOCITOS POR OVARIO (PROM ± DE)
98	196	350	3.69 ± 2.49	1.85 ± 1.25

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En el presente estudio se aspiraron 196 ovarios de 98 vacas criollas haciendo un total de 350 ovocitos del cual se obtuvieron en promedio (PROM ±DE) 1.85 ± 1.25 ovocitos por ovario y 3.69 ± 2.49 por animal según la tabla 3.1, siendo menor a trabajos presentados en rendimientos por ovario como el de Quispe *et al* (2015) quien obtuvo un 5.2 ovocitos en razas Holstein, 7

ovocitos Brown swis y 9 ovocitos en Simental. Figueredo *et al.* (1997) mencionan que los resultados podrían ser influenciados principalmente por la raza donadora, estado nutricional, edad y condiciones climáticas, la diferencia entre razas en número de folículos y la dinámica folicular del ovario.

Los ovocitos fueron recuperados de ovarios de vacas criollas donde se aspiraron diámetros foliculares $\geq 1 < 7$ mm de acuerdo a un trabajo realizado por Segura *et al.* (2015). Estos fueron subdivididos en tres parámetros D1 ($\geq 1 < 3$ mm), D2 ($\geq 3 < 5$ mm) y D3 ($\geq 5 < 7$ mm), el diámetro de 1 mm no es utilizada en la práctica pues de acuerdo a Motlik y Fulka citados por Santa Cruz (2012), los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de ovocitos incompetentes o bien atrésicos, mientras que los mayores de 10 mm presentan un mayor número de ovocitos degenerados. Por ello, la mayoría de los autores seleccionan folículos antrales de diámetros comprendidos entre 2 y 8 mm. Sin embargo existen trabajos como de Castilho *et al.* (2002) quienes en diámetros foliculares < 5 mm, 5-7 mm y > 7 mm obtuvieron un desarrollo embrionario por fecundación *in vitro* de 80.46 %, 19.53 % y 0% respectivamente.

Por otra parte Segura *et al.* (2015) en diámetros de 1- 2 mm, 3 – 4 mm y 5 – 6 mm obtuvo competencias meióticas de 89 %, 85% y 25%, resultados similares al presente trabajo por tener mejores resultados en tamaño foliculares $<$ de 5mm según la tabla 3.6, esto podría atribuirse a que gran proporción de ovocitos obtenidos de diámetros $<$ 2mm contienen ovocitos mayores de 110 μ m medida apta para maduración *in vitro* asimismo la

correcta selección y clasificación antes de la maduración de los ovocitos es un proceso que reduce las opciones de elegir un ovocito atrésico, refutando así la idea de la dependencia folicular del ovocito en la capacidad de maduración.

3.2 SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS

Tabla 3. 2: Promedio de ovocitos recuperados por animal y ovario según calidad en bovinos criollos del Matadero de Quicapata -Ayacucho-2016

N° DE OVARIOS	OVOCITOS			PROMEDIO OVOCITOS POR ANIMAL (PROM ± DE)	PROMEDIO OVOCITOS POR OVARIO (PROM ± DE)
	TOTAL	CALIDAD	N°		
196	350	A	218	2.28 ± 2.02	1.14 ± 1.01
		B	132	1.41 ± 0.68	0.7 ± 0.34

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

El promedio de recuperación (PROM ± DE) fue 2.28 ± 2.02 de ovocitos calidad A y 1.41 ± 0.68 calidad B por animal, asimismo 1.14 ± 1.01 calidad A y 0.7 ± 0.34 de ovocitos calidad B por ovario mostrados en la tabla 3.2, la tasa de recuperación por ovario fue similar en comparación con otros reportes como Zárate en el (2006) quien obtuvo un 1.59 de calidad A y 1.32 de calidad B; Carolan *et al.* (1994) 4.2 de calidad A y Lonergan *et al.* (1991) 1.55 calidad A. Esto puede deberse por el criterio de clasificación de cada autor pues los criterios de A, B, C y D son diferentes basados principalmente en el citoplasma células del cúmulus y zona pelúcida en el trabajo se tomo el criterio de Leibfried y First (1979) y Fry *et al* (1997)

mencionadas (Capítulo II 2.5-d). Ahuka, Montiel y Ponciano (2013) explican que este proceso es importante pues de las características morfológicas del ovocito a madurar dependerá que reinicie la meiosis y la maduración citoplasmática para su maduración *in vitro*, el éxito de la fertilización *in vitro* y el desarrollo embrionario.

➤ **Clasificación de ovocitos del diámetro D1**

Tabla 3. 3: Número de ovocitos según calidad del diámetro D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata- Ayacucho 2016

DIÁMETRO FOLICULAR	OVOCITOS		
	CALIDAD	Nº	%
D1	A	102	68
	B	48	32
TOTAL		150	100

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

La tabla 3.3 muestra que el diámetro D1 tiene un porcentaje de 68 % de ovocitos calidad A frente a un 32 % de calidad B. Los datos obtenidos se pueden observar en la siguiente gráfica.



Gráfico 3. 1: Porcentaje de ovocitos según calidad del diámetro D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016

➤ **Clasificación de ovocitos del diámetro D2**

Tabla 3. 4: Número de ovocitos según calidad del diámetro D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016

DIÁMETRO FOLICULAR	OVOCITOS		
	CALIDAD	Nº	%
D2	A	93	62
	B	57	38
TOTAL		150	100

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

La tabla 3.4 muestra que el diámetro D2 tiene un porcentaje de 62% de ovocitos calidad A frente a un 38 % de calidad B. Los datos obtenidos se pueden observar en la siguiente gráfica.

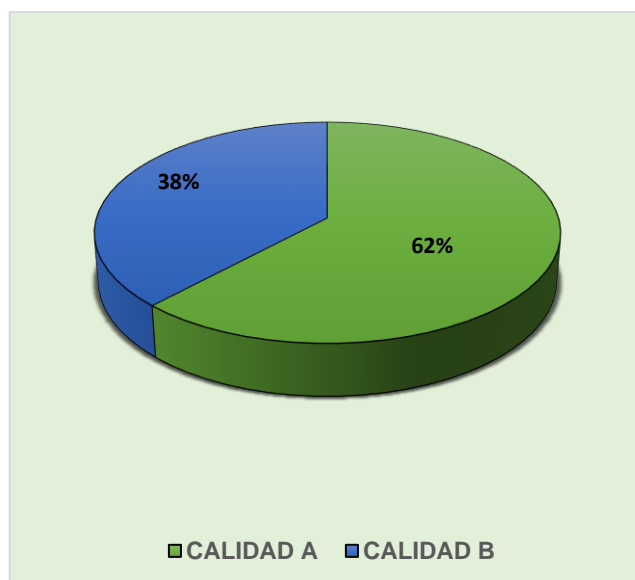


Gráfico 3.2: Porcentaje de ovocitos según calidad del diámetro D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016

➤ **Clasificación de ovocitos del diámetro D3**

Tabla 3. 5: Número de ovocitos según calidad del diámetro D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016

DIÁMETRO FOLICULAR	OVOCITOS		
	CALIDAD	Nº	%
D3	A	23	46
	B	27	54
TOTAL		50	100

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

La tabla 3.5 muestra que el diámetro D3 tiene un porcentaje de 46 % de ovocitos calidad A frente a un 54 % de calidad B. Los datos obtenidos se pueden observar en la siguiente gráfica.

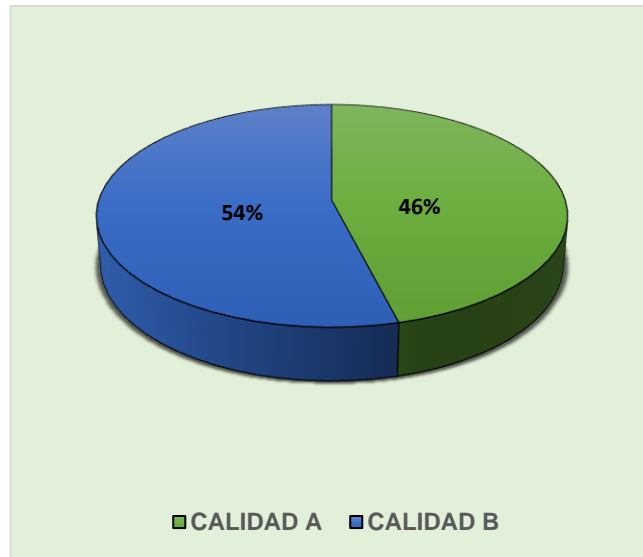


Gráfico 3. 3: Porcentaje de ovocitos según calidad del diámetro D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata-Ayacucho 2016

Después de describir las tablas 3.3 .3.4 y 3.5 con sus respectivos gráficos se observa que el mayor porcentaje de calidad A se encuentra en diámetros D1 y D2 mientras calidad B en el diámetro D3, frente a la relación de diámetro folicular con la calidad de ovocitos obtenidos, no se cuenta con estudios experimentales. No obstante Makabe *et al.* (2006) explica que los resultados tal vez son influencias por patrones hormonales, ya que a menor diámetro folicular <5 mm el crecimiento es dependientes de FSH que se encargan del crecimiento ovocitario y a diámetros >5mm son ovocitos en inicios o plena selección para maduración donde sufren cambios hormonales dependientes de LH pues a mayor grado de maduración se van perdiendo las uniones GAP y las células del cúmulus se disocian siendo frágiles a la aspiración. Otros factores técnicos son los mencionados por Bols *et al.* (1996) y Fry *et al.* (1997) como: el método de aspiración,

operador, diámetro de la aguja, presión, entre otros que hace difícil la comparación de los resultados obtenidos entre laboratorios.

3.3 CONGELACIÓN Y EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DE OVOCITOS POST DESCONGELACIÓN

Tabla 3. 6: Viabilidad de ovocitos post descongelación según diámetro folicular en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

DIÁMETRO FOLICULAR	Nº DE OVOCITOS CONGELADOS	Nº DE OVOCITOS VIABLES	Nº DE OVOCITOS NO VIABLES
D1 (≥ 1 < 3 mm)	150	81 ^a	69 ^a
D2 (≥ 3 < 5 mm)	150	87 ^a	63 ^a
D3 (≥ 5 < 7 mm)	50	18 ^b	32 ^b
TOTAL	350	186	164

^a Diferencia no estadística entre filas (P>0.05)

a, b Diferencia estadística entre filas (P<0.05)

En la tabla 3.6 se muestra la viabilidad post descongelación de ovocitos relacionados con el diámetro folicular de origen en cuyo resultados se encontró una diferencia significativa (p<0.05) en los diámetros D1 (54%) y D2 (58%) en comparación con el D3 (36%) respectivamente. Las primeras investigaciones en congelación lenta de ovocitos bovinos fueron reportados por Lim *et al.* (1991); Fuku *et al.* (1992); Otoi *et al.* (1995); pero no se reportan trabajos en criopreservación de ovocitos en vacunos criollos menos relacionados con el diámetro folicular. Mientras en congelación de

ovocitos bovinos en general Mavrides y Morroll (2002) mencionan que en ovocitos congelados por el método lento, posteriormente descongelados y cultivados por 2 horas, la tasa de supervivencia fue de 54%; Zárate en el (2006) obtuvo un 27 % de viabilidad a la evaluación morfológica post descongelación, tras analizar nuestros resultados, podemos decir que la tasa de supervivencia en términos generales de 53 % es mayor o relativamente inferior a investigaciones anteriormente realizadas. Los datos obtenidos también se pueden observar en la siguiente gráfica.

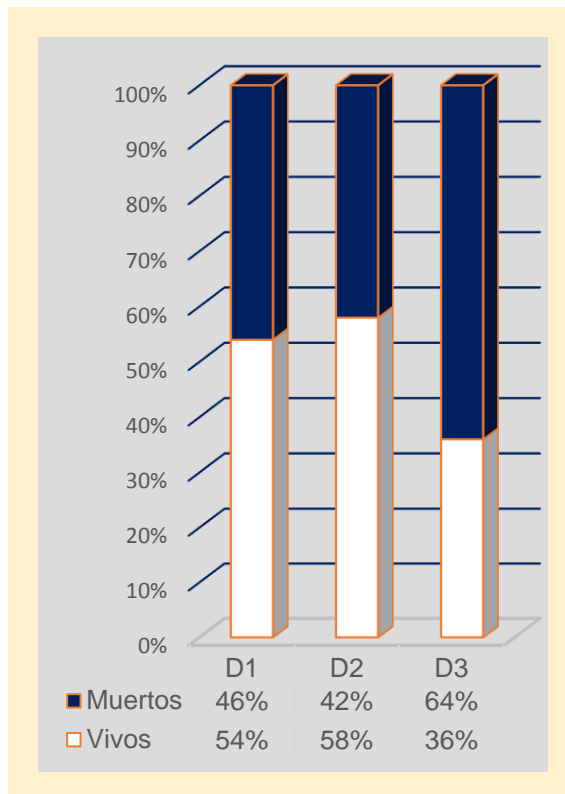


Gráfico 3. 4: Porcentaje de viabilidad post descongelación de ovocitos según diámetro folicular en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

Al no contar con referencias sobre trabajos anteriores de viabilidad post descongelación de ovocitos según diámetro folicular, los resultados de mayor viabilidad en diámetros $\geq 1 < 5$ mm según Mc Williams *et al.* (1995)

podrían explicarse porque los ovocitos a mayor grado de maduración sus componentes subcelulares son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura, osmolaridad e iones.

Así también Shaw *et al.* (2000) menciona que el ovocito es una gran célula y por tanto tiene una baja relación de área de superficie a volumen, esto impide la sobrevivencia post criopreservación viéndose alterada principalmente la zona pelúcida por liberación prematura del contenido de granulos corticales, disrupción de la membrana plasmática, desorganización extensiva del citoplasma y alteraciones en el citoesqueleto, Magistrini y Szolozsi (1980) dicen que a mayor tamaño o volumen los ovocitos contienen más agua y proporcionalmente menos superficie para que esta salga y para que entren las sustancias crioprotectoras penetrantes, todo esto se implica en la viabilidad del ovocito pues existe una relación directamente proporcional entre el ovocito y el diámetro folicular en cuestión de tamaño. El cual coincide con Merryman (1971) quien propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad.

Otra referencia con la que concordamos es la de Mathews y colaboradores (2003) los cuales hablan sobre la importancia de los lípidos (colesterol y ácido graso) como componentes más abundantes de la membrana plasmática pues determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación el empaquetamiento y la posición de estas moléculas en las bicapas determinarían la rigidez de las membranas y por tanto el transporte de moléculas.

Este transporte a través de membranas es el punto crítico para la supervivencia celular post descongelación. otra explicación puede ser a nivel de composición estructural pues Zeron *et al.* (2001) y Fouladi *et al.* (2007) refieren que la proporción de ácidos grasos linoleicos es significativamente menor en folículos grandes que en folículos pequeños existiendo una relación inversa, estos cambios también se reflejan en la composición de ácido graso de los ovocitos que contienen los folículos.

Así también Seidel (2006) menciona que las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C - 16°C alterando de esta manera las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad, durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones normales post descongelación.

Otra causa a considerarse es la mencionada por Makabe *et al.* (2006) que relaciona la viabilidad post descongelación con factores microambientales debido a modificaciones en la concentración de gonadotropinas que sufre el ovocito durante la foliculogénesis con cambios metabólicos y estructurales en él que implican gasto de energía, esto dificulta la resistencia a temperaturas bajas.

Cabe mencionar que una ventaja de la congelación de ovocitos de diámetros foliculares < 5mm según Eroglu *et al.* (1988) es que son inmaduros y tienen los cromosomas condensados y localizados dentro del núcleo o vesícula germinal están protegidos por la membrana nuclear a diferencia de las cromosomas del ovocito en MII, en el ovocito inmaduro no se han formado el huso meiótico así previene la alteración del huso y las aneuploidías en las futuras crías.

Para realizar mejor la evaluación post descongelación se hizo un examen visual de la integridad de las membranas ovocitarias, zona pelúcida y normalidad del citoplasma inmediatamente después de ser descongelados la validez de la clasificación morfológica se confirmó con tinción vital de exclusión azul de tripán teniendo en cuenta las características mencionadas (Capítulo II 2.5-f) obteniéndose los siguientes resultados:

✓ **Evaluación de viabilidad post descongelación del D1**

Tabla 3. 7: Clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

DIÁMETRO FOLICULAR	N° DE OVOCITOS	OVOCITOS VIABLES				OVOCITOS NO VIABLES			
		EXCELENTE		BUENO		REGULAR		MALO	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
D1	150	10	7	71	47	50	33	19	13

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

La tabla 3.7 del diámetro D1 muestra los siguientes porcentajes de evaluación: 7 % excelente, 47 % bueno, 33% regular y 13 % malo. Los datos obtenidos se pueden observar en la siguiente gráfica.

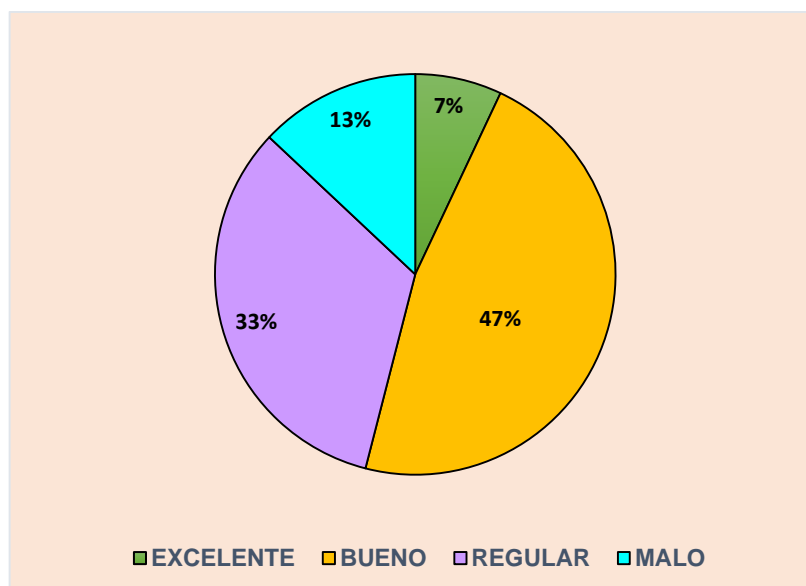


Gráfico 3. 5: Porcentaje de clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

✓ **Evaluación de viabilidad post descongelación del D2**

Tabla 3. 8: Clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

DIÁMETRO FOLICULAR	Nº DE OVOCITOS	OVOCITOS VIABLES				OVOCITOS NO VIABLES			
		EXCELENTE		BUENO		REGULAR		MALO	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
D2	150	36	24	51	34	42	28	21	14

FUENTE: FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

La tabla 3.8 del diámetro D2 muestra los siguientes porcentajes de evaluación: 24 % excelente, 34 % bueno, 28 % regular y 14 % malo. Los datos obtenidos se pueden observar en la siguiente gráfica.

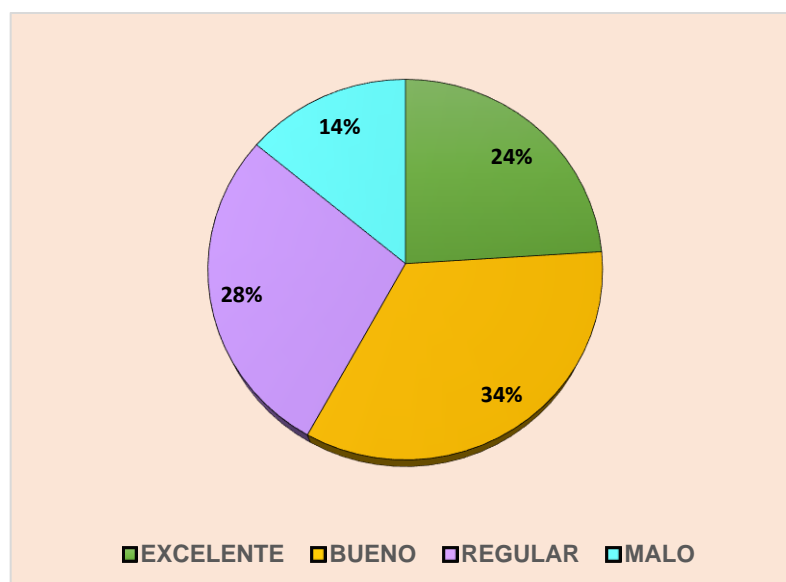


Gráfico 3. 6: Porcentaje de clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

✓ **Evaluación de viabilidad post descongelación del D3**

Tabla 3. 9: Clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

DIÁMETRO FOLICULAR	Nº DE OVOCITOS	OVOCITOS VIABLES				OVOCITOS NO VIABLES			
		EXCELENTE		BUENO		REGULAR		MALO	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
D3	50	2	4	16	32	17	34	15	30

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

La tabla 3.9 del diámetro D3 muestra los siguientes porcentajes de evaluación: 4 % excelente, 32 % bueno, 34 % regular y 30 % malo. Los datos obtenidos se pueden observar en la siguiente gráfica.

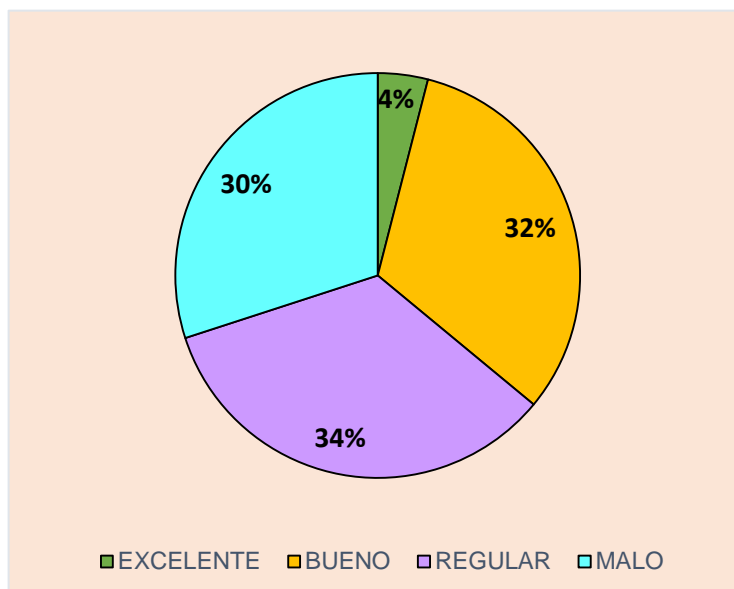


Gráfico 3. 7: Porcentaje de clasificación de ovocitos post descongelación del diámetro folicular D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

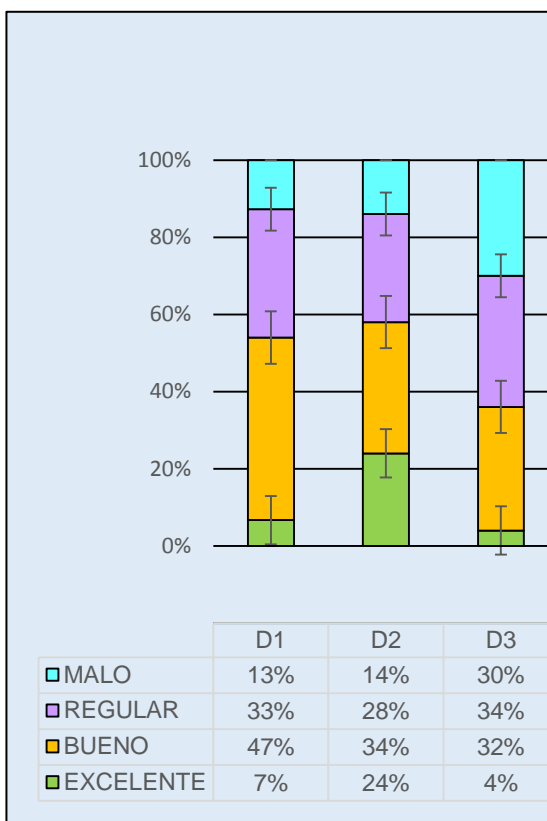


Gráfico 3. 8: Comparación de calidad de ovocitos post descongelación de los diámetros foliculares D1, D2 y D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

Después de analizar las tablas y gráficos anteriores vemos que el gráfico 3.8 muestra el consolidado de los resultados de evaluación post descongelación en ovocitos donde se obtuvo mejores porcentajes de calidad en diámetros D1 y D2 comparados con el D3, en promedios generales 13.7% fueron de calidad excelente, 39.4 % bueno, 31.1 % regular y 15.7 % malo; siendo similares a los resultados obtenidos en un trabajo realizado por Gómez y colaboradores (2010) usaron tres categorías para la evaluación morfológica post descongelación de ovocitos bovinos vitrificados obtenidos de diámetros folículos de 2-6mm; A (cúmulus compacto y ovoplasma homogéneo), B (ovocitos desdudos y ovoplasma

homogéneo) y C (ovocito fragmentado ovoplasma con vesículas) obteniendo los siguientes porcentajes A (34.5 %), B (9.1 %) y C (56.4 %).

Esto puede estar influenciada por muchos factores de pre congelación como el método de congelación, tipo de crioprotector, el tiempo de exposición. Asimismo el número de células del cúmulus antes de la congelación, Imoedmhe y Sigue (1992) opinan que la presencia de estas sirve como escudo contra las modificaciones osmóticas repentinas y el estrés ocasionado por la concentración, dilución de los crioprotectores, durante el proceso de equilibrio y remoción de estos después del descogelamiento.

Eppig (1994) explica la importancia de las células del cúmulus que se introducen a través de la zona pelúcida y forman uniones GAP con el ovocito que permiten el intercambio de moléculas y nutrientes, los cuales si se llagaran a dañar pondrían en peligro la viabilidad del ovocito. Por otro lado Mathews y colaboradores (2003) manifiestan que existe variaciones en la arquitectura de la membrana y zona pelúcida (grosor, área de sección transversa y permeabilidad para un determinado soluto) pues de acuerdo a Nikas *et al.* (1994) los poros más pequeños que pertenecen a la zona pelúcida de la vaca lo cual dificulta el proceso de deshidratación y la difusión del crioprotector al interior, opiniones con los cuales coincidimos

IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. La viabilidad post descongelación de ovocitos en bovinos criollos de diámetro folicular D1 y D2 tuvieron una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al D3. Por lo tanto la viabilidad post descongelación fue mayor en diámetros $\geq 1 < 5$ mm.
2. La viabilidad post descongelación de ovocitos en bovinos criollos de diámetro folicular D1 no tuvo una diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto al D2.
3. Es factible criopreservar ovocitos de bovinos criollos afín de conservar el valioso material genético, para ser utilizados en futuros trabajos de fecundación *in vitro*, clonación y la creación de bancos de germoplasma; pues necesitamos al ganado criollo para recuperar genes favorables como el de adaptabilidad a la altura, rusticidad, sobriedad e implementar programas de cruzamiento alterno para hacer ganadería en nuestra sierra.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Para posteriores trabajos realizar evaluación de viabilidad más sofisticados como pruebas tinción: Fluorocromo Diacetato de Fluoresceína (actividad enzimática), Ioduro de Propidium (integridad de la membrana), prueba de TUNEL (Terminal Deoxinucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling) que consiste en detectar la cascada de señales apoptóticas que causan la fragmentación del ADN etiquetando el extremo de los ácidos nucleicos asimismo cultivos de maduración y fecundación *in vitro* para ver reanudación del proceso meiotico.
2. Realizar trabajos de congelación según edad o etapa reproductiva de las vacas.
3. Realizar trabajos de criopreservación de ovocitos según ecotipos del vacuno criollo ayacuchano.
4. Realizar trabajos de congelación de ovocitos maduros e inmaduros.
5. Realizar trabajos de congelación versus vitrificación según diámetro folicular.
6. Realizar trabajos de criopreservación de gametos en bovino criollos y así crear bancos de germoplasma para futuros trabajos.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adams, GP., Jaiswal, R., Singh, J., Malhiet, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*; 69: 72-80.
- Adams GP. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*; 54: 17-32.
- Adams GP. 1998. Control of ovarian follicular wave dynamics in immature and prepubertal cattle for synchronization and superstimulation. *Proceedings of the XX congress of the world association for buiatrics*, 2: 595-605.
- Ahuka, C., Montiel, F., & Ponciano, P. 2013. Producción In Vitro y transferencia de embriones en bovinos. Veracruz, México.
- Arlotto, T., Schwartz, J.L., First, N.L., Leibfried, M.L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45: 943-956.
- Ávila, P., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J. y Reguero, M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4): 291-300.
- Bajo A.J.M. y Coreleu L.B. 2009. Fundamentos de Reproducción. Criopreservación de gametos y embriones. España. Ed. Panamericano. Pp.269-280.

- Bouquet, M., Selva, J., Aureoux, M. 1993. Cryopreservation of mouse oocytes: Mutagenic effects in the embryo? *Biology of Reproduction*, 49: 764-769.
- Bols, P. E. J., Van Soom, A., Ysebaert, M. T., Vandenheede, J. M. M., de Kruif, A. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. Vol. 46, pp. 1001-1014.
- Calvo, Juan J.; Deborah, Robert; Mónica, Viqueira y Paula Lombide. 2015. Vitrified and *in Vitro* Matured Oocytes Viability from Adult Housecat (*Felis catus*) in Reproductive Season *Int. J. Morphol.* vol.33 no.4 Temuco dic.
- Carolan, C., Monaghan, P., Gallagher, M., Gordon I. 1994. Effect of recovery method of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*, 41: 1061-1068.
- Castilho, G.S., Assis, J.M., García. 2002. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore.
- Celestinos M. y Gatica R. 2002. Vitrificación como técnica de criopreservación de embriones bovinos. *Arch. Med. Vet.* 34(2):157-165.
- Chen C. 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*; 1: 884-896.

- Clarke, H., Hope S., Byers, S y Rodgers R. 2006. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction*; 132: 119-131.
- Coelho, L.A., Esper, C.R., Alvarez, R.H., Vantini, R., Almeida-Jr, I.L. and Liguori, A.C. 1998. Assessment of viability of bovine embryos produced *in vitro* by using trypan blue dye. *Ars Vet*, 14: 277-284.
- Delgado A.García. 2016. Bovino Criollo en el Peru. Actualidad ganadera.
- Devjak, R., Fon, Tacer K., Juvan, P., Virant, Klun I., Rozman, D., Vrtacnik, B. 2012. Cumulus Cells Gene Expression Profiling in Terms of Oocyte Maturity in Controlled Ovarian Hyperstimulation Using GnRH Agonist or GnRH Antagonist. *Plos One*.
- Diez, C., Duque, P., Gómez, E., Hidalgo, C.O., Tamargo C., Rodríguez A., Fernández L., Varga S., Fernández A., Facal N., Carbajo M. 2005. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*, 64: 317-333.
- Driancourt MA. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*; 55: 1211-1239.
- Dumoulin J.C.M., Marj J., Pieters H.E.C. 1994. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertility and Sterility*, 62: 793-798.
- Emiliani, S., Van den Bergh, M., Vannin, A.S., Biramane, J. and Englert, Y. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and

glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum. Reprod.*, 15(4): 905–910.

- Eppig JJ. 1994. Further reflections on culture systems for the Growth of oocytes in vitro. *hum reprod* 9:974-976
- Eroglu A., Toner M., Leykin L., Toth T.L. 1998. Cytoskeleton and polyploidy after maturation, and fertilization of cryopreserved germinal vesicle-stage mouse oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet*, 15: 447-454.
- Evans, A., Ireland, J.L., Winn, M., Lonergan, P., Smith G., Coussens, P., Ireland, J.J. 2004. Identification of Genes Involved in Apoptosis and Dominant Follicle Development During Follicular Waves in Cattle. *Biology of reproduction*; 70: 1475-1484.
- Fabbri, R., Porcu E., Marsella, T. 2000. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 169: 39-42.
- Fahy G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 23: 1-13.
- FAO. 1998. Management of small populations at risk. In: *Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans*.
- Fernández Reyes F., J.E. Hernández Pichardo, Gabriela Castellanos García. 2012. Viability Of *In Vitro* Immature And Matured Pig Oocytes Vitrified With Ethylen Glycol And Trehalose *Rev Salud Anim.* vol.34 no.1 La Habana ene.-abr.

- Figueiredo, R., Barros, C., Pinheiro, O., Soler J. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore Beed (Bos indicus) Cattle, *Theriogenology* ;47:1489-1505
- Filipiak, Y. & Larocca, C. 2012. Utilización del azul tripán para diferenciar ovocitos bovinos vivos y muertos en fertilización *in vitro*. *Arch. Zootec.*, 61(234):309-12.
- Florman, H., Ducibella, T. 2006. Fertilization in Mammals. En *The Physiology of Reproduction*, Knobil and Neill. Edited by Neill, J., Third edition. Elsevier.Academic Press, USA. 2: 56-75.
- Forde, N., Mihm, M., Canty, M., Zielak, A., Baker, P., Park, S., Lonergan, P., Smith G., Coussens, P., Ireland, J., Evans, A. 2008. Differential expression of signal transduction factors in ovarian follicle development: a functional role for betaglycan and FIBP in granulosa cells in cattle. *Physiol Genomics*; 33: 193-204.
- Friedler, S., Giudice, L., Lamb, E. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertility and Sterility*, 49: 743-764.
- Fry, R. C., Niall, E. M., Simpson, T. L., Squires, T. J., Reynolds, J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*. Vol. 47, pp. 977-987.
- Fukue, kojima Shioyay., Marcus, GJ and Downey BR. 1992. *in vitro* fertilization and devepmente of frozen –thawed bovine oocytes. *cryobiology* 29 (4):485-492

- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., Lazzari, G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55: 1341.
- García J.V. 1984. Criopreservadores concepto y manejo. *Biol.Clin.Hematol*; 6(219).
- Gilbert S. 2005. Desarrollo embrionario. 7a Edición, Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires., p. 902.
- Gilchrist, R., Lane, M., Thompson, J. 2008. Oocyte secreted factors regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reprod. Update*. 14: 159-177.
- Gómez, O.J., Restrepo, B.G., Vásquez, A.N. 2010. Efecto del etilenglicol sobre la morfología post-desvitrificación de oocitos bovinos inmaduros *Rev. Lasallista Investig.* vol.7 no.1 Caldas
- Gook, D., Osborn, S., Johnson, W. 1993. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2 propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Human Reproduction*, 8: 1101-1109.
- Gordon I. 1990. Embryo transfer and asociated techniques in cattle. In gordon (ed) *controlled reproduction in catle and buffaloes*, CAB International University Press, Cambridge, 245-371.
- Gordon I., Lu H. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology*, 33: 77-87.
- Gupta, P.S.P., Ravindranatha, B.M., Nandi, S. and Sarma, P.V. 2002. Trypan blue staining to differeniate live and dead buffalo oocytes and

its effect on embryo development *in vitro*. National Institute of Animal Nutrition and Physiology. Bangalore. Karnataka.

- Guyader-Joly C. 1998. Activité métabolique et aptitude a la congélation de l'embryon bovin produit in vitro. Thèse Doctorale.
- Hafez E. Hafez B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Ed. McGraw-Hill interamericana. México. pp. 70-82.
- Hafez E.S.E. 1996. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Mc Graw Hill Interamericana, DF., México. 542 pp.
- Hamano S., Kuwayama M. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of the individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39: 703-712.
- Hatzirodos, N., Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H., Rodgers, R. 2004. Transcriptome Profiling of the Theca Interna in Transition from Small to Large Antral Ovarian *Follicles*. Vol. 9: 5.
- Imoedmhe, D.G., Sigue, A.B. 1992. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2 propanediol. *J Assist Reprod Genet*. 9: 323-327.
- Jewgenow, K. and Stolte, M. 1996. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats viability and ultrastructural investigations. *Anim Reprod Sci*, 44: 183-193.

- Joo Yi, Y., Sutovsky, P. 2011. Gamete binding and fusion. En Oocyte maturation and fertilization: a long history for a short event. Tosti, E. and Boni R. Eds. Bentham Books. Italy, pp. 93-103. **K**
- Kallen, C., Billheimer, J., Summers, S., Stayrook, S., Lewis, M., Strauss, J. 1998. Stereoidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J. Biol. Chem.*; 273: 26285-26288.
- Kasai, M., Hamaguchi, Y., Zhu, T. S. E., Miyake, T., Sakurai, T. and Machida, T. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-basesolution by a simple method. *Biol. Reprod.*, 46: 1042-1046.
- Kathryn M. S., John E. P. 1999. Effects of Cryopreservation Procedures on the Cytology and Fertilization Rate of In Vitro-Matured Bovine Oocytes. *Biology of Reproduction*, 61: 168-187.
- Kato, Y. and Tsunoda, Y. 1996. Low temperatura preservation of mouse fetal germ cells at 4°C. *Theriogenology*, 45: 1029-1035.
- Krisher, R. 2004. The effect of oocyte quality development. *J. Anim. Sci.* 82: 14-23.
- Kruij, T.A., Boni R., Roelofsen M.W.M., Wurth Y.A., Pieterse M.C. 1993. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 39: 251.
- Kruij, T.A., Boni, R., Wurt, Y.A., Roelofsen, M.W.M., Pieterse, M.C. 1994. Potencial use of Ovum Pick-Up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 42: 675-684.

- Larocca, C., Calvo, J., Lago, I., Roses, G. y Viqueira, M. 2004. Diferentes fuentes de líquido folicular en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos. Arch Zootec, 53: 329-332.
- Lehnjensen, H., Greve, T. 1982. The survival of cow blastocysts frozen in 1,4M glicerol after plunging between -15 and -60 and rapid thawing. *Theriogenology*, 17: 95.
- Leibfried, M.L., Critser, E.S., Parrish, J.L., Fist, N.L. 1989. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 31: 6174.
- Leibfried, L.y First, N. 1979. characterization of bovine folicular oocytes and their ability to mature in vitro. *anim.sci.v.48.p.76*
- Leibo S.P. 1986. Cryobiology: preservation of mammalian embryos. *Basic Life Scientific*, 37: 251-272.
- Leibo S.P. 1980. Water permeability and its activation energy of fertilized and un- fertilized mouse ova. *Journal of Membrane Biology*, 53: 179-188.
- Lewin, A., Tal, Z., Zohav, E. and Schenker, J.G. 1990. Ultrarapid freezing and thawing of hámster oocytes: morphological parameters, trypan blue staining and sperm penetration assay for evaluating survival. *J Reprod Med*, 35: 136-140.
- Lim JM,Fukui y and Ono H. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 35:1225-1235

- Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H., Gordon, I. 1991. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for IVM. *Theriogenology*, 35: 231.
- Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L., Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41: 62-72.
- Lucy MC. 2007. The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of Animal Science* 85: E89-E99.
- Machatkova, M., Jokesova, E., Petelikova, J., Dvoracek, V. 1996. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*. Vol. 45(4), pp. 801-81.
- Madison, V., Avery, B., Greve, T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* Vol 27, pp. 1-11.
- Magistrini, M., Szollosi, D. 1980. Effects of cold and of isopropyl N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocyte. *Eur. J. Cell. Biol.* 22: 699-707.
- Makabe S, Naguro T and Stallone T. 2006. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microsc Res Tech*: 69:436-449.

- Manual Merck, KGaA. 2004. 64271. Darmstad. Alemania. Microscopía. 1.11732 Azul Tripán (C.I.23850) <http://pb.merck.de/servlet/PB/show/1288950/111732es.pdf> (18/12/2008).
- Marina, S., Marina, F., Torres, P.J., Fosas, N., Martín, P., Alcolea, R., Pérez, N., Fernández, S., Arnedo, N., Jové I., Hochman, M., Suñol, J. 2002. Congelación de ovocitos para reproducción asistida. Revista Iberoamericana de Fertilidad, 19: 59-68.
- Martínez, M., Herrero, L., Megías, D., Salvanés, R., Cobo, A., García, J. 2011. Efecto de la Criopreservación en la Morfología, Conformación del Huso Meiótico y en el ADN del ovocito Volumen 95, Número 1. Páginas 374-377.
- Mathews, KM., Van, Holde KE., Ahern, KG. 2003. Biochemistry. third edition. addison wesley.
- Maurer, R. 1978. Freezing of mammalian embryos: A review of the techniques. Theriogenology, 9: 45-68.
- Mavrides A., Morroll D. 2002. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete. *Reprod. Nutr. Dev*, 42: 73– 80.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. The American Journal Physiology, 247: 125-142.
- Mazur P., Shneider U. 1986. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. Cell Biophys, 8: 259-285.

- Mazur, P., Shneider, U., Mahowald, A.P. 1992. Characteristics and kinetics of subzerochilling injury in *Drosophila* embryos. *Cryobiology*, 29: 39-68.
- McWilliams, R.B., Gibbons, W.E., Leibo, S.P. 1995. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. *Human Reproduction*, 10: 1163-1171.
- Merton, J.S., Roos, A.P.W., Mullaart, E., Ruigh, L., Kaa, I L., Vos P.L.A.M., Dieleman S.J. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59: 651-674.
- Mihm, M., Baker, P., Ireland, J., Smith, G., Coussens, P., Evans, A., Ireland, J. 2006. Molecular Evidence That Growth of Dominant Follicles Involves a Reduction in Follicle- Stimulating Hormone Dependence and an Increase in Luteinizing Hormone Dependence in Cattle. *Biology of reproduction*; 74: 1051-1059.
- Miyake, T., Kasai, S. E. Zhu, T. Sakurai, T. Machida. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylen based solution by a simple method. *Theriogenology* 40: 121-134.
- Moore, K., Thatcher, W., 2006. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*; 89: 1254-1266.
- Newton H., Pegg D.E., Barrass R. 1999. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocytes. *J. Reprod. Fétil*, 117: 27-33.

- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology*, 35: 109-124.
- Nikas, GT Paraschos, A Psychoyos, A.H Handyside. 1994. The zona reather in human oocytes as seen with scanning electros microscopy. *hum reprod* 9 2135-213.
- Otoi, T.,yamamoto, K., koyama, N and Suzuki T. 1995. In vitro fertilization and desenvolpente of inmature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology* 32(5):455-460
- Palma G. 2008. *Bioteconología de la reproducción*. Segunda edición. Ed. Reprrobiotec. Córdoba. Pp 73-90.
- Pedro P.B., Zhu S.E., Makino N.1997.Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology*, 35: 150-158.
- Peter AT, Vos PL, Ambrose D. 2009. Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*; 71: 1333-1342.
- Pickering, S.J., Johnson, M.H. 1987. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reproduction*, 2: 207-216.
- Pliego, G. Respuesta ovárica a un estímulo superovulatorio con diferentes niveles de FSH en ovinos pelibuey. 2005. Tesis, Médico Veterinario y Zootecnista Universidad Veracruzana, Veracruz, México.en línea, Consultado: Mayo 11 2016 .<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/177/1/GuadalupePliegoPalacios.pdf>

- Porcu, E., Fabbri, R., Seracchioli, R., Ciotti, P.M., Magrini, O. and Flamigni, C. 1997. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril*: 68:724-726.
- Primer Informe Nacional sobre la situación de los Recursos Zoogenéticos. Comisión Nacional de Recursos Zoogenéticos. 2004. Lima, Perú, pp. 66.
- Primo, A.T. 1992. El ganado bovino Ibérico en las Américas: 500 años después. *Arch. Zootec.* 41(extra): 421-432.
- Ptaszynska M. 2008. Compendium de reproducción animal. Octava edición. Internet internacional.
- Quispe, C; E. Fernández, E; Ancco, K. Oriundo; E. Mellisho. 2015. Efecto de la raza de la donadora sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal.
- Rege, J.E.O. & J.P. Gibson. 2003. Animal genetic resources and economic development: tissues in relation to economic valuation. *Ecological Economics* 45: 319-330.
- Rivas Palma, V.E., E.R.G. Rivas Seoane, E.A. Veli Rivera, G. Gutiérrez Reynoso & S.H. 2004. Pastor Soplín. Proyecto caracterización de recursos Zoogenéticos en función a caracteres utilitarios de la Dirección Nacional de Investigación de Recursos Genéticos del INIEA. In: Memorias del V Simposio Iberoamericano sobre la conservación y utilización de Recursos Zoogenéticos, pp. 193-196.

- Rodgers R, Irving-Rodgers H. 2010. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biology Of Reproduction.*; 82: 1021-1029.
- Rodríguez, M., G. Fernández, C. Silveira, J.V. Delgado. 2001. Estudio Étnico de los bovinos criollos del Uruguay: I. Análisis Biométrico. *Arch.Zootec.* 50: 113-118.
- Rosemberg, M. 2002. Variabilidad genética de vacunos criollos y de doble propósito. Artículos y resúmenes del I Congreso Peruano de Genética Animal. Lima, Perú.
- Salamone DF, Adams GP, Mapletoft RJ. 1999. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology*; 52: 549-561.
- Santa Cruz, C. 2012. Efecto de tres suplementos macromoléculas (PVA, PVP y BSA) sobre la tasa de maduración, división y desarrollo embrionario in vitro de ovocitos bovinos procedentes de ovarios obtenidos de camal. Lima, Perú.
- Segura, G.T., Cortez, J.V., Cayo, I.S. 2015. Capacidad de Maduración in Vitro de Ovocitos Obtenidos de Foliculos de tres tamaños diferentes en Bovinos.
- Seidel GE JR. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*; 65:228-35.
- Sekine, J., Sakurada, T., Oura, R. 1992. Optimum temperature of ovarian transportation for in vitro fertilization of bovine oocytes. *Veterinary record*, 131: 372.

- Seneda, M.M., Esper, C.R., Garcia, J.M., Oliveira, J.A., Vantini R.2001.Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, 67: 37-43.
- Senger PL.2005.Pathways to pregnancy and parturi- tion. Segunda edición. Current conceptions inc. Wash- ington.
- Senger, P.2003.Pathways to pregnancy and parturition. 2ª Edition. Current Conceptions Inc. Pullman, Washington, USA. pp. 287-325.
- Shaw J.M.Trounson A., Gardner D.1993. andbook of in vitro fertilization. CRC Press. Boca Raton Florida p. 33431.
- Shaw J.M., Oranratnachai A., Trounson A. O.2000.Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53: 59-72.
- Shaw J.M., Ward C. and Trounson A.O.1995.Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Hum. Reprod.*, 10(2): 396-402.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., Hosseini, S., Karimi, I.2007. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during *in vitro* maturation. *Small Rumin. Res.* 68: 291-295.
- Sierra, I. 2001. El concepto de raza: evolución y realidad. *Arch. Zootec.* 50:547-564.
- Sirard M, Desrosier S, Assidiet M.2007. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmen- tal competence. *Theriogenology*; 68: 71-76.

- Sirard, M. A. and First, N. L. 1998. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Rep.* Vol. 39, pp. 229-234.
- Stachecki JJ, Cohen J, Schimmel T and Willadsen SM. 2002. Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconvectonal freezing médium *cryobiology* 44:5-13
- Su Y-Q, Sugiura K, Eppig J. 2009 .Mouse Oocyte Control of Granulosa Cell Development and Function: Paracrine Regulation of Cumulus Cell Metabolism. *Journal Seminars in Reproductive Medicine.* 27: 32–42.
- Tervit H.R. 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenil 1357(2001breeding. *Animal Reproduction Science*, 42: 227-235.
- Tsafiriri, A., Dekel, N. 2011. Intra and intercellular molecular mechanisms in regulation of meiosis in murid rodents. En: *Oocyte maturation and fertilization: along history for a short event.* Edited by Tosti, E. and Boni, R. Eds. Bentham Books, Italy. pp. 38-63.
- Uribe, L., Correa, A., Henry, J. 2009. Características del crecimiento folicular Ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud* 8: 117-131 disponible en: Mayo 11, 2016, http://200.21.104.25/biosalud/downloads/Revista%208_14.pdf.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 51: 53-58.

- Van, Blerkom J., Davis, P.W. 1994. Cytogenetic, cellular and developmental consequences of cryopreservation of immature and human oocytes. *Microscopy. Res. Tec*, 27: 165-193.
- Vandyke H.C y Gray H.1918. *Anatomy of the Human Body*
- Vila L. 1984. Principio químico-físico de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol*, 6: 227-236.
- Vila L., García J. 1983 Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. *Biol Clin Hematol*, 5: 135- 142.
- Vincent, C., Johnson, M.H. 1992. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford reviews of reproductive biology*, 14: 73-100.
- Voelkel, S. A., Hu, Y. X. 1992. The use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37:687-697.
- Wassarman, P. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 283: 24285- 24289.
- Watson, A. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and Embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.* 85: E1-E3.
- Webb R, Armstrong DG. 1998. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock production science*; 53: 95-112.

- Webb, R., Garnsworthy, P., Campbell, B., Hunter, M. 2007. In- tra- ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology*; 68: 22-29.
- Webb, R., Garnsworthy, P., Gong, J., Armstrongy, D. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nu- tritional influences. *Journal of Animal Science.*; 82: 63-74.
- Weimer, K. E., Watson, A. J., Polanski, V., Mc. Kenna, A. I., Fick, G.H., Schultz, G. A. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. and Dev.* Vol. 30, pp. 330-338.
- Werven F, and Amon A. 2011. Regulation of entry into gametogenesis. *Philosophical Transactions.of the Royal. Society. B.* 366, 3521–353.
- Zárate O. 2006. Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos, tesis de maestría. Universidad Veracruzana Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-México.
- Zhu, W.J., Liu, X.G., Wen, R.Q., Wang, C.X. 1990 .Human sperm cryobiological characteristics: comparative cryopreservation techniques. *Archives of Andrology*, 24: 95-96.
- Zielak, AE., Forde N., Park, SD., Doohan, F., Coussens, PM., Smith, GW. 2007. Identification of novel genes associ- ated with dominant follicle development in cattle. *Reprod Fertil Dev*; 19: 967-975.

ANEXO

Anexo 1: Principales morfotipos del criollo ayacuchano en el Matadero de Quicapata Ayacucho-2016



FUENTE: PROPIA

Anexo 2: Materiales para búsqueda y selección de ovocitos



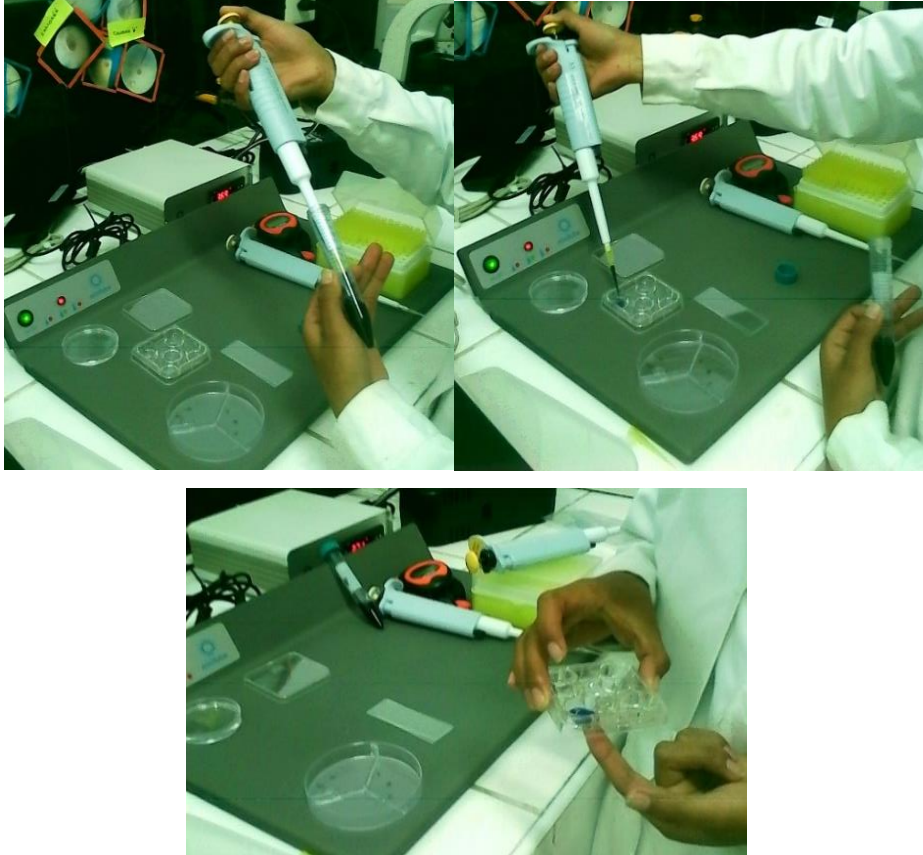
FUENTE: PROPIA

Anexo 3: Materiales para evaluación post descongelación de ovocitos



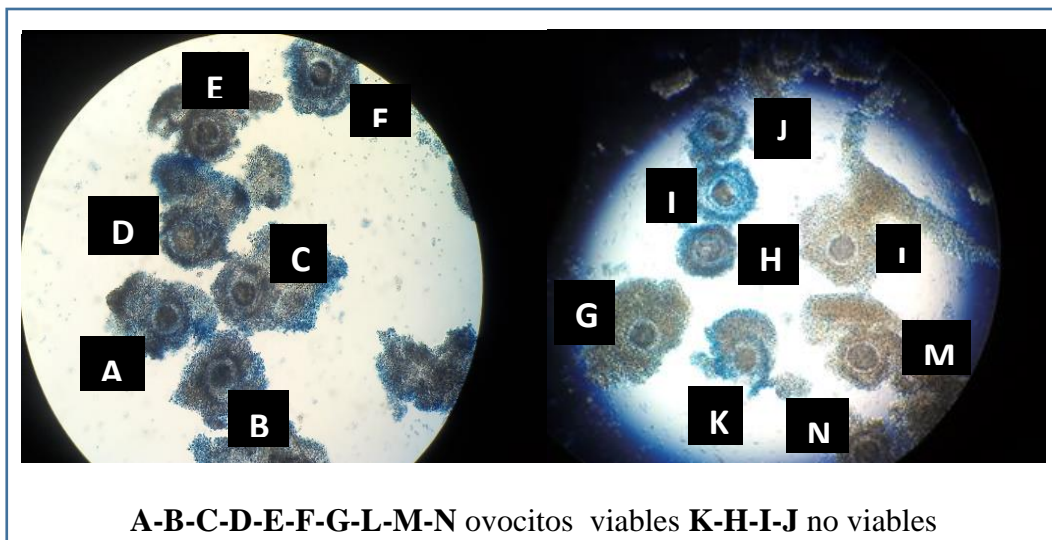
FUENTE: PROPIA

Anexo 4: Proceso de tinción por exclusión azul de tripán en ovocitos obtenidos de bovinos criollos



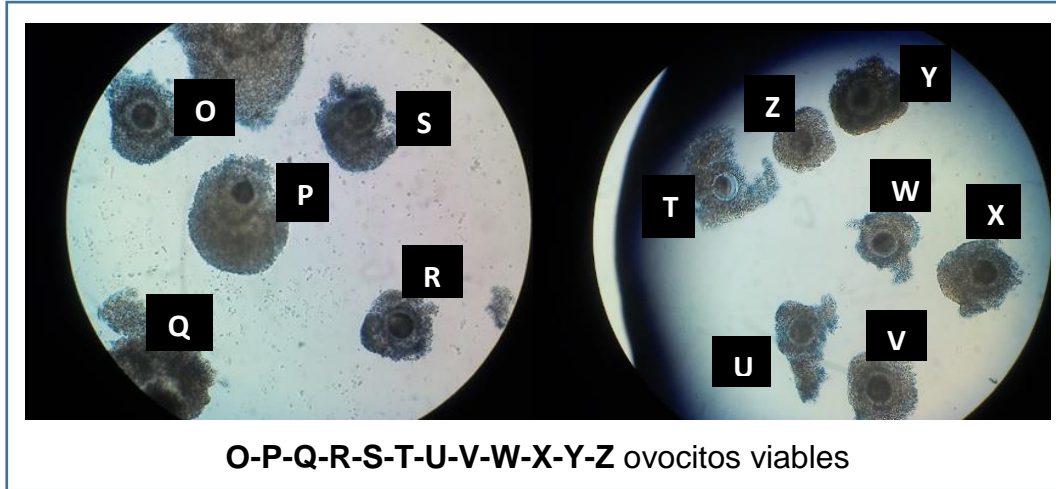
FUENTE: PROPIA

Anexo 5: Ovocitos post descongelación de diámetros D1 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.



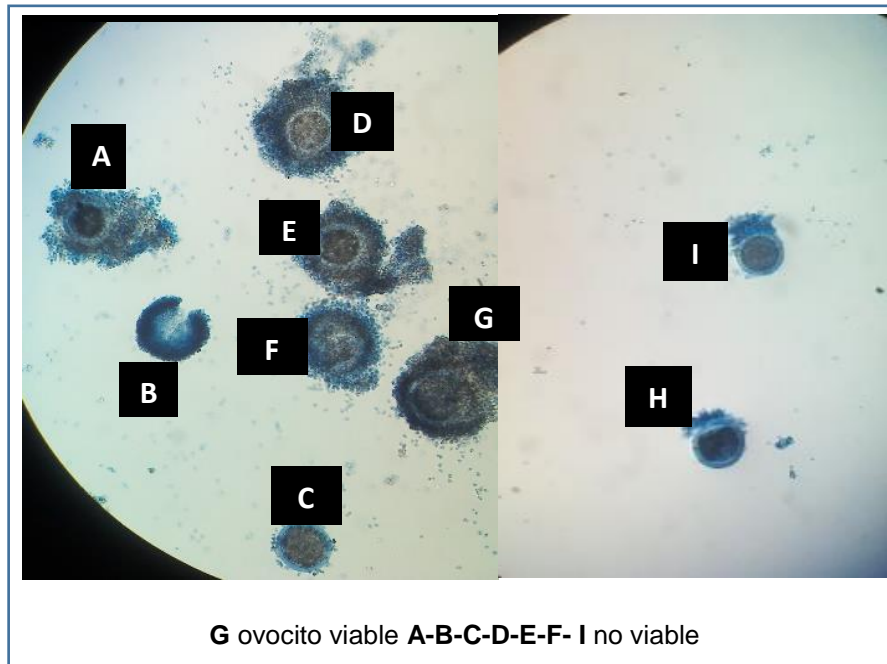
FUENTE: PROPIA

Anexo 6: Ovocitos post descongelación de diámetros D2 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.



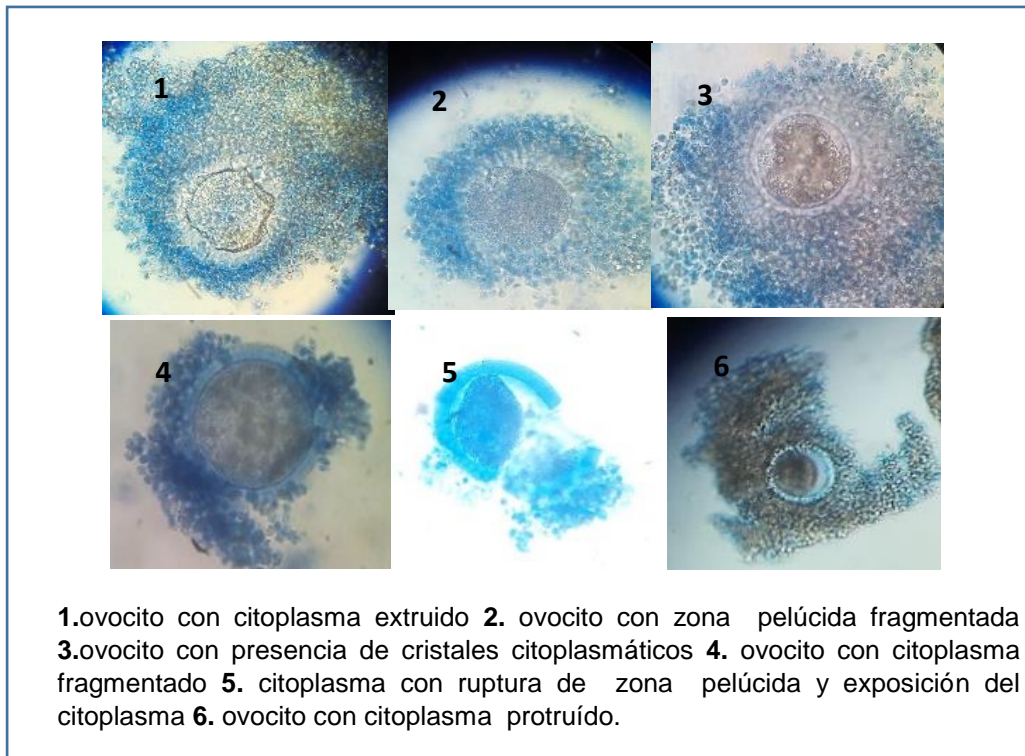
FUENTE: PROPIA

Anexo 7: Ovocitos post descongelación de diámetros D3 en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.



FUENTE: PROPIA

Anexo 8: Daños morfológicos en ovocitos post descongelación en bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016.



FUENTE: PROPIA

Anexo 9: Colección de ovarios por día en el Matadero de Quicapata-Ayacucho-2016

Fecha	Nº de vacas	Nº de ovarios
07-07-16	4	8
09-07-16	5	10
14-07-16	4	8
17-07-16	10	20
21-07-16	10	20
08-08-16	11	22
12-08-16	8	16
13-08-16	12	12
21-08-16	10	20
02-09-16	9	18
04-09-16	13	26
TOTAL	96	192

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Anexo 10: Preparación de solución salina al 0.9 %

INSUMOS	CANTIDAD 1 l
NaCl	90 gr
Gentamicina	100ul
Agua destilada	enrazar

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Anexo 11: Preparación de medio de manipulación

INSUMOS	CANTIDAD 40 ml
PBS	39.2 ml enrazar
SFB (2%)	800 ul

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Anexo 12: Microscopio Accu -Scope®



FUENTE: PROPIA

Anexo 13: Estereoscopio Nikon®



FUENTE:PROPIA

Anexo 14: Congeladora Freeze Control CL 5500 Cryologyc®



FUENTE:PROPIA

Anexo 15: Registro de colección de ovarios y ovocitos de bovinos criollos del Matadero de Quicapata Ayacucho-2016

FECHA	N° DE ANIMALES	DIÁMETRO ≥1mm< 3mm							DIÁMETRO ≥3mm< 5mm							DIÁMETRO ≥5mm< 7mm								
		CALIDAD PRECONGELACIÓN			VIABILIDAD POST DESCONGELACIÓN				CALIDAD PRECONGELACIÓN			VIABILIDAD POST DESCONGELACIÓN				CALIDAD PRECONGELACIÓN			VIABILIDAD POST DESCONGELACIÓN					
		A	B	TOTAL	E	B	R	M	A	B	TOTAL	E	B	R	M	A	B	TOTAL	E	B	R	M		
07/07/2016	4																	2	5	7	1	2	1	3
09/07/2016	5							5	5	10	3	3	3	1				3	3				1	2
14/07/2016	4	12		12		6	3	3	6	4	10	3	3	3	1									
17/07/2016	10	30	6	36	4	14	10	8	36	16	52	15	14	11	12	2	3	5	1	1	2	1		
21/07/2016	10	20	11	31	3	13	11	4	16	8	24	4	10	7	3	7	3	10		3	3	4		
08/08/2016	11	15	7	22		13	9		5	9	14	2	5	5	2	2	3	5		2	2	1		
12/08/2016	8	3	4	7	1	3	3		4	4	8		6	2	3	5	8		3	5				
13/08/2016	12	4	7	11		6	3	2							3		3		1				2	
21/08/2016	10	3	9	12		6	6		10	3	13	3	4	6										
02/09/2016	9	5	4	9		6	3		11	8	19	6	6	7		3	3		1	2				
04/09/2016	13	10		10	2	4	2	2							4	2	6		2	2		2		
TOTAL	96	102	48	150	10	71	50	19	93	57	150	36	51	42	21	23	27	50	2	16	17	15		

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA