

64
2cl.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRANSPORTE
DE OVARIOS, DESDE EL RASTRO AL
LABORATORIO, EN LA MADURACION IN VITRO
DE OVOCITOS BOVINOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ARAMINTA PEREZ MARTINEZ



ASESORES: M.S. SALVADOR ROMO GARCIA.
DVM. JAVIER VALENCIA MENDEZ.

MEXICO, D. F.

1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A Dios porque me doy cuenta que no soy nada si Tú no lo quisieras, porque no lograría nada si no lo permitieras, a Ti a quien agradezco por Jesucristo, por la vida, las oportunidades, las experiencias y todos mis logros así como los fracasos y debilidades.

A mis padres: Carlos y Sara Delia con amor porque esta es la plasmación del final de todo su amor y paciencia así como todos sus esfuerzos y sacrificios, para hacerme un individuo productivo que sirva a Dios, a su patria y a la naturaleza.

¡Gracias! por esta gran oportunidad, que no desaprovechare. Les amo.

A Alberto Gómez M. con cariño por ser el motor y el aliciente para concluir este trabajo, por todo su ánimo y por todo su amor, por ser el presente y el futuro lleno de compromiso, amor, felicidad y trabajo en equipo.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores: M.S. Salvador Romo y a DVM Javier Valencia, por su tiempo, ayuda, apoyo, paciencia y cariño mostrado a lo largo de mi estancia en el laboratorio de FIV.

Al MVZ. Jaime Navarro Sánchez por brindarme sus conocimientos, su tiempo y su valiosa ayuda en la parte estadística de esta tesis, en especial por su amistad.

A mi jurado, integrado por MVZ Arturo Olgin y B., el MVZ Luis Zarco Q., el MVZ. Antonio Porras A., MVZ. Joel Hernández C., y el MVZ., Salvador Romo G. por su tiempo y sabias opiniones para que esta tesis fuera entendible y cumpliera los requisitos establecidos por el Reglamento General de Exámenes.

Al MVZ. Alberto Ramírez Guadarrama por su ayuda y apoyo de todos los tiempos, por su comprensión, por su amistad real y sincera mostrada en los últimos cinco años.

Al MVZ. Ramón Mier y en especial al MVZ. Javier Hernández I. por su ayuda y largas horas de colaboración en este trabajo por sus palabras de aliento y por ser unos excelentes compañeros.

Al Depto. de Reproducción Animal y a todos sus integrantes por permitirme tener el espacio físico para la realización de esta investigación como les agradezco mucho a todos.

A mis hermanos Carlos Raúl y César porque la vida a su lado ha sido divertida, llena de vivencias agradables y pruebas muy especiales.

A Ma. Luisa Galbiatti Reyes por ser un ejemplo de fortaleza, ternura y amor sincero por ser copartícipe con Raúl Martínez en la creación de uno de los seres más importantes para mí.

A mis amigos: Patricia Escalona, Silvia Alemán, Mónica Martínez, Alfonso Campos y Gustavo García, por su sincera amistad y por estar en uno de los momentos claves de mi vida.

A todos aquellos que de una u otra forma intervinieron cotidianamente en la realización de esta tesis y que lo siguen haciendo en mi maravillosa experiencia de vivir.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- PRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES BOVINOS (PIVEB)	7
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.- RESULTADOS	26
5.- DISCUSIÓN	31
6.- CONCLUSIONES	33
ANEXO 1	38
ANEXO 2	39

RESUMEN

Pérez Martínez Araminta. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRANSPORTE DE OVARIOS DESDE EL RASTRO AL LABORATORIO, EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS. (Bajo la dirección del M.S.: Romo García Salvador y del DVM. Valencia Méndez Javier).

El presente trabajo tuvo como objetivo el comparar el efecto de dos rangos de temperatura de transportación de ovarios, sobre la maduración *in vitro* de embriones bovinos. El experimento se realizó en las instalaciones del laboratorio de Fertilización *in vitro* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se utilizaron un total de 43 ovarios obtenidos en el Rastro Municipal de Tlalnepantla, Edo. De México. Los ovarios fueron retirados dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio, escogiéndose solo los ovarios que presentaron estructuras foliculares. Los ovarios se lavaron con Solución Salina Fisiológica adicionada con antibióticos (SSFm), a 37°C y se distribuyeron al azar en dos grupos: Grupo 1. Formado por 17 ovarios, fueron transportados al laboratorio en SSFm dentro de una bolsa de plástico con cierre de presión, en baño maría a una temperatura de 22 a 25°C, dentro de un recipiente térmico. Grupo 2. Formado por 26 ovarios, que se transportaron en la misma forma a una temperatura de 35 a 37°C en un termo. Para la obtención de los ovocitos, los ovarios fueron sometidos a los procesos de aspiración y disección de folículos. Una vez obtenidos, los ovocitos se clasificaron con un microscopio estereoscópico según la técnica de De Loos. Solo se utilizaron los de categoría 1 (con cubierta celular múltiple y compacta, ovoplasma homogéneo y complejo *cumulus*- ovocito ligero y transparente) y categoría 2 (con cubierta celular múltiple y compacta, ovoplasma homogéneo pero con apariencia de una zona más oscura en la periferia del ovocito y complejo *cumulus*- ovocito ligeramente oscuro y menos transparente que los de categoría

1), después se colocaron en cajas de incubación de 4 pozos con 500µl de medio de maduración, el cual fue preparado con medio TCM-199, suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado, 50 µl de LH, 50 µl de FSH y 0.1% de Penicilina-Estreptomicina, con pH de 7.4. Las cajas con los ovocitos se mantuvieron en incubación durante 24 h a una temperatura de 39°C, con 5% de CO₂ y una humedad relativa de 100%. Posteriormente los ovocitos se vortearon 3 minutos, se fijaron por 24 h. y se tiñieron con un colorante a base de ácido acético y orceína, para determinar el grado de maduración nuclear. Los resultados indican que no existe evidencia suficiente para afirmar que el transporte de los ovarios, desde el rastro al laboratorio, con una temperatura ya sea entre 22 a 25°C o entre 35 a 37°C, modifique substancialmente la proporción de ovocitos madurados. Por lo que en el aspecto práctico es más conveniente el transporte de ovarios a un rango de temperatura de 22 a 25°C, pues este rango es más cercano a la temperatura ambiente y por lo tanto resulta más fácil de conservar.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRANSPORTE DE OVARIOS DESDE EL RASTRO AL LABORATORIO, EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS BOVINOS.

1.- INTRODUCCIÓN

En México, se requiere impulsar la biotecnología reproductiva aplicada a diversos procedimientos para la manipulación del proceso reproductivo de los animales domésticos. Esta tecnología incluye aspectos tales como (26):

- 1.1 Ovulación múltiple y transferencia de embriones.
- 1.2 Producción *in vitro* de embriones.
 - Colección de ovocitos.
 - Maduración *in vitro* de ovocitos.
 - Capacitación espermática.
 - Fertilización *in vitro* de ovocitos.
 - Desarrollo *in vitro* de ovocitos fertilizados (cigotos).
- 1.3 Multiplicación de embriones:
 - Por bisección.
 - Por clonación o transferencia nuclear.
- 1.4 Sexado de embriones.
- 1.5 Congelación de embriones.
- 1.6 Transferencia de genes.
- 1.7 Producción de gemelos.
- 1.8 Sexado de fetos.

Esta área ha logrado grandes avances, especialmente en la producción *in vitro* de embriones de distintas especies animales domésticas (3,9,10,23,24,35), silvestres (36) y de laboratorio (12).

Por medio de la de producción *in vitro* de embriones se hace posible madurar, fertilizar y desarrollar óvulos no fertilizados bajo condiciones de laboratorio (26), lo que constituye una de las bases para el mejoramiento genético de especies animales domésticas (10,32,40), para la producción de animales de laboratorio (24) o bien para preservar especies en peligro de extinción (34).

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) es un proceso que consiste en una serie de operaciones secuenciales de colección, maduración, fertilización *in vitro*, capacitación espermática y desarrollo *in vitro*, las cuales pueden relacionarse con otros procesos de la biotecnología reproductiva, tal como se observa en el Diagrama 1.

Algunos investigadores afirman que las condiciones en que se realizan la colección y maduración *in vitro* de ovocitos, influyen en el éxito de la fertilización *in vitro* (27) así como en el grado de desarrollo que los embriones llegan a alcanzar (2).

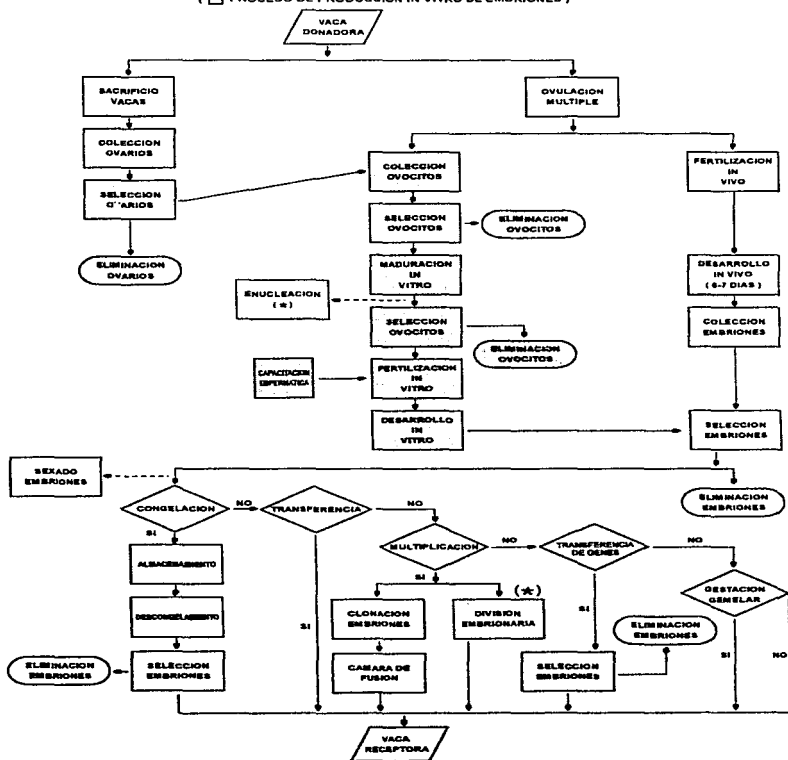
Las condiciones que influyen sobre la maduración *in vitro* son variadas, entre algunas de ellas se encuentran:

- Colección de ovocitos (31)
- Calidad de los ovocitos utilizados (7,20,)
- Tipo de medio utilizado (2,30)
- Tiempo (en horas) de incubación (8).
- Atmósfera de incubación (1,37)
- Temperatura de incubación (8)

Si bien se conoce la influencia que tiene cada una de las condiciones anteriormente señaladas, las condiciones del transporte de ovarios hasta el laboratorio han sido poco

DIAGRAMA 1

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA
 (□ PROCESO DE PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES)



estudiadas (30) y la información específica del efecto que sobre la maduración *in vitro* pueda tener la temperatura de transportación de ovarios, desde el rastro al laboratorio no se encuentra disponible hasta el momento.

En el ganado bovino, diferentes autores informan éxito en esta técnica cuando los ovarios son transportados desde el rastro hasta el laboratorio manteniendo una temperatura fija de 37 °C (14,20,21,29) ó bien rangos entre 22 a 27°C (2,9,11) ó entre 35 a 39 °C (8,14,28,41) en distintos tiempos de transporte, que van desde 1 a 3 h (6,8,14,27,41) hasta 8 a 9 h (9,11).

Debido a lo anterior es importante investigar si la temperatura de transporte es un factor que afecta o no el porcentaje de maduración *in vitro* y por tanto la producción *in vitro* de embriones, utilizando los rangos de 22 a 25°C y 35 a 37 °C, durante el transporte con un tiempo promedio de 80 minutos.

Además es importante señalar que las temperaturas de transporte se escogieron tomando en cuenta la facilidad de utilizar rangos de temperatura, más que una temperatura fija, por ejemplo: el rango de 35 a 37°C es más fácil de mantener constante, que la temperatura fija de 37°C. Para determinar el segundo rango de temperatura se tomó en consideración que los cambios degenerativos en las gónadas se ven más favorecidos utilizando temperaturas de 30 a 37°C que si se utilizan 20 a 25°C (4). También se tomo como base el protocolo utilizado por Hawk y Wall (11), que transportaron a la misma temperatura tanto ovarios como oviductos, tomando en cuenta que la mejor temperatura de transporte de estos últimos es de 22 a 25°C (las células del oviducto son utilizadas como co-cultivo en el medio de desarrollo *in vitro*), así como lo que mencionan Kruij y colaboradores (16) de que la temperatura más propicia para el transporte de ovarios de cerdas es de 24°C.

La hipótesis de esta investigación es la siguiente: la temperatura de transporte de los ovarios bovinos desde el rastro hasta el laboratorio influye en el porcentaje de maduración *in vitro* de los ovocitos, siendo el rango de temperatura de 22 a 25°C el que permite alcanzar mayores porcentajes de maduración de ovocitos, en comparación con el rango de 35 a 37°C.

El realizar este trabajo tiene como objetivos:

- 1.- Evaluar el efecto de la temperatura de transporte de los ovarios, desde el rastro al laboratorio, en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.
- 2.- Determinar que rango de temperatura es el más adecuado y a su vez práctico de mantener, para obtener la mayor proporción de ovocitos madurados *in vitro*.
- 3.- Contribuir al establecimiento de una metodología aplicable en México.

2.- PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS (PIVEB).

2.1 COLECCIÓN DE OVOCITOS.

Diversos autores recomiendan que la obtención de ovocitos en el bovino se realice: en vacas vivas o cuando la vaca se acaba de sacrificar. Estas dos técnicas se describen a continuación:

2.1.1 Colección de ovocitos en vacas vivas.

Para la colección de ovocitos en vacas vivas existen dos métodos (35):

1. Punción de ovocitos por ultrasonido transvaginal.
2. Aspiración por laparoscopia.

2.1.1.1. Punción de ovocitos por ultrasonido transvaginal.

Las vacas son seleccionadas ya sea por palpación rectal o determinación de los niveles de progesterona en sangre.

Por vía vaginal se introduce manualmente la sonda de un aparato de ultrasonido, la cual ha sido modificada para llevar en su interior una aguja hipodérmica conectada a una bomba de vacío, por medio de una manguera (25).

La aguja atraviesa la pared del fondo de la vagina y se pone en contacto con el ovario manipulado por vía rectal. Con la ayuda visual del monitor del ultrasonido se inserta la misma en el ovario, dirigiéndola hacia la corteza del mismo. Se aspiran los folículos

mayores o iguales a 3 mm de diámetro. Esta misma operación puede repetirse hasta 3 veces por ciclo (35). El líquido aspirado se mantiene a una temperatura de 37 °C y dentro de los siguientes 15 minutos se clasifican los ovocitos en el laboratorio (14).

Este método se usa en explotaciones donde las vacas son superovuladas, obteniendo buenos resultados cuando los óvulos se transfieren en fresco a vacas receptoras (15) o bien para usarse en técnicas de transferencia nuclear (clonación) y/o transferencia de genes (9), después de que éstos han madurado *in vitro*.

2.1.1.2. Aspiración por laparoscopia.

Este método es útil para coleccionar los folículos maduros, una vez que los ovarios han sido localizados. Los folículos preovulatorios son aspirados a una presión de 110 mm de Hg, el líquido aspirado se conserva a una temperatura de 34 °C durante el transporte hasta llegar al laboratorio, en donde los óvulos son localizados, clasificados y fertilizados *in vitro* (17).

Debido a que este método requiere de experiencia para optimizar los resultados (31), hasta el momento se utiliza generalmente en proyectos de investigación (17).

2.1.2. Colección de ovocitos en vacas sacrificadas.

Para la colección de ovocitos en vacas sacrificadas el método es el siguiente:

De 10 a 30 minutos posteriores al sacrificio (6,22,41), los ovarios de vacas y/o vaquillas se obtienen para ser transportados hasta el laboratorio, en tiempos que van desde 1- 3 horas (6,8,27,35,41) hasta 8 -9 h (9,11), utilizando una de las temperaturas mostradas en el Cuadro 1:

Cuadro 1		
TEMPERATURAS DE TRANSPORTE DE OVARIOS, DESDE EL RASTRO HASTA EL LABORATORIO, UTILIZADAS POR DIFERENTES AUTORES		
TEMPERATURA °C	AUTOR / AUTORES	REFERENCIA
25 -26	Hawk	11
25 -27	Fayrer - Hosken	6
30	De Loos	20
30 - 35	Shamsudin, Sirard	28,30
33 -37	Takagi	31
35	Madison	21
39	Kato	14

Una vez que los ovarios llegan al laboratorio se procede a obtener los ovocitos inmaduros por uno de los siguientes procedimientos:

1. Aspiración de foliculos (15,18,28,30,41).
2. Disección cuadricular de los ovarios (3,16,20,31).

2.1.2.1. Aspiración de foliculos.

Este método consiste en aspirar foliculos de 2 a 7 mm de diámetro con una aguja hipodérmica del número 18 conectada, ya sea a una jeringa con embudo de plástico de 10 ml (4,18,20,21,28,30) o a una bomba de vacío con una presión de 50 mm de Hg (11). Se deposita el líquido colectado en tubos de 50 ml (4,11,20,41) para que precipite durante 15 minutos (41). Posteriormente el sedimento se extrae con una pipeta Pasteur y se coloca dentro de una caja de Petri para que los ovocitos se busquen, laven y clasifiquen (16,31,35).

Se ha demostrado que los foliculos mayores de 3 mm de diámetro, poseen ovocitos con un estado de desarrollo que favorece su desarrollo nuclear cuando son madurados *in vitro* (7).

Este método es el más rápido de los métodos de recolección de ovocitos (35).

2.1.2.2. Disección cuadrangular de ovarios.

Este método consiste en realizar un lavado de los ovarios con solución salina fisiológica (SSF). Después de éste, se realizan cortes a lo largo (longitudinales) y ancho (transversales) de la corteza de los mismos, posterior a cada corte se realiza un lavado con solución salina fosfatada (PBS) o con solución tyrode - lactato modificada (Talp- Hepes). El líquido se colecta en cajas de Petri y bajo el microscopio estereoscópico los ovocitos se buscan, se lavan y clasifican (16,31,35).

La disección es el método más efectivo para recobrar ovocitos en mayor cantidad, con buena calidad de la cubierta de células *cumulus* (25,31). El inconveniente de este método es que el tiempo usado es mayor que el usado en cualquier otra técnica de recolección, y su uso se limita a pequeños grupos de ovarios, porque al ser mayor el tiempo empleado presenta más oportunidades de contaminación (35).

2.2 Lavado de ovocitos

Este método consiste en pasar los ovocitos de la caja de Petri de búsqueda a otra con medio nuevo, denominada de lavado, esto se realiza cuantas veces sea necesario utilizando micropipetas con puntas nuevas y estériles en cada ocasión.

El lavado puede efectuarse con diferentes soluciones, las más comunes son: PBS, Talp - Hepes y el medio que se utiliza para madurar. El número de lavados más común varía

de 3 a 4, dependiendo del laboratorio. El Cuadro 2 describe la forma en que se realiza el lavado de ovocitos en 7 laboratorios diferentes:

Cuadro 2 SOLUCIONES Y NUMERO DE REPETICIONES UTILIZADOS EN EL LAVADO DE OVOCITOS						
REFERENCIA	PRIMERA SOL. DE LAVADO			SEGUNDA SOL. DE LAVADO		
	PBS	Medio maduración	Talp - Heps	PBS	Medio maduración	Talp - Heps
2	0	1	0	0	1	0
11	0	0	4	0	0	0
14	0	1	0	0	1	0
21	0	3	0	0	0	0
28	0	0	3	0	1	0
31	2	0	0	0	1	0
41	0	4	0	0	0	0

Donde 0, 1, 2, 3 y 4 representan el número de lavados con esa solución.

2.3. Selección de ovocitos.

El grado de maduración depende en gran parte de la calidad de los ovocitos, por lo que estos deberán ser seleccionados.

De las clasificaciones más aceptadas se encuentra la que en 1989 hizo de De Loos, que clasifica en 4 categorías al complejo *cumulus* - ovocito basándose en lo compacto y transparente de la capa de células *cumulus* y la homogeneidad y transparencia del ovoplasma (20). Ésta se muestra en el cuadro 3:

CUADRO 3 DE OVOCITOS DE De LOOS (1989)			
CLASIFICACIÓN			
CATEGORÍA	COMPLEJO	CUMULUS -	OVOCITO
	Cubierta celular	Ovoplasma	Complejo <i>cumulus</i> - ovocito
1	Múltiple y compacta	Homogéneo	Ligeramente transparente
2	Múltiple y compacta	Homogéneo pero con apariencia de una zona más oscura en la periferia del ovocito	Ligeramente obscuro y menos transparente
3	Poco compacta	Irregular con agrupaciones oscuras	Más obscuro que las categorías 1 y 2
4	Expandida, hay células de <i>cumulus</i> distribuidas en puntos oscuros con una matriz gelatinosa	Irregular con puntos o agrupaciones oscuras	Obscuro e irregular

2.4. MADURACIÓN *IN VITRO*.

El medio base para la maduración *in vitro* más utilizado es el TCM- 199 con sales de Earle (8,14,18,20,21,28,38) (Anexo 1):

Este medio es adicionado con una de las siguientes fuentes de proteína (Cuadro 4):

Cuadro 4
FUENTES DE PROTEÍNAS ADICIONADAS AL MEDIO DE
MADURACIÓN *IN VITRO*

TIPO	REFERENCIA
Suero fetal bovino Inactivado * 10%	1, 11, 14, 20, 28, 30,
Suero Fetal Bovino Inactivado* 5%	18
Suero de Vaca en Estro w/v 20%	17, 30
Albúmina Sérica Bovina	8

* con calor a 56 °C, durante 30 minutos.

Además, se adicionan antibióticos (Cuadro 5), como:

Cuadro 5
ANTIBIÓTICOS ADICIONADOS AL MEDIO DE
MADURACIÓN *IN VITRO* Y DOSIFICACIÓN

ANTIBIÓTICO	DOSIS	REFERENCIA
Penicilina G	31 µg/ml	14
Gentamicina	50 µg /ml	21, 30
Penicilina G - Sulfato de Estreptomicina	a) 50 - 100 UI/ml, 50 - 100 mg./ml b) 10000 UI - 10 mg./ml de medio para obtener una concentración final de 20 UI - 20 mg./ml de medio.	a) 28, 38 b) 11

También se ha suplementado con una o más de estas hormonas (Cuadro 6):

Cuadro 6		
HORMONAS ADICIONADAS AL MEDIO DE MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> Y DOSIFICACIÓN		
Hormona	Cantidad	Referencia
Hormona Luteinizante (LH)	50 µg/ml	11
	5 µg/ml	1,29,37
	10 µg/ml	14
	50 - 100 µg/ml	41
	1 µg/ml	20
Hormona Foliculo Estimulante (FSH)	2 µg/ml	20
	10 µg/ml	27
	5 µg/ml	1,29,37
Hormona coriónica humana (HCG)	1 UI /ml	28
Estradiol (E ₂)	1 µg/ml	14,20,28,30

Otras sustancias añadidas se muestran en el Cuadro 7:

Cuadro 7		
DIVERSAS SUSTANCIAS AÑADIDAS AL MEDIO DE MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>		
Substancia	Concentración	Referencia
Piruvato de Na (0.25 mmol)	10 % v/v	11,28
Piruvato de Na (0.2 mM)	55 µg/ml	41
	no especificado	21
Piruvato de Na	0.5 mM	14
L - glutamina	0.4 mM	21,29
Glucosa	5.5 mg /ml	41

Finalmente, también se adiciona el siguiente tipo de células para reproducir las interacciones celulares que le ocurren durante el final de la maduración al ovocito en el folículo: Células de granulosa en una concentración de 2×10^6 (8,15,20,28).

El medio se prepara el mismo día de su uso (41) y debe tener un pH de 7.4 (28).

El medio se coloca en forma de microgotas de 100 microlitros cubiertas con aceite mineral estéril (21,28), o gotas de 500 microlitros no cubiertas con aceite mineral estéril (11,14,37,38), en cajas de Petri (35 x 10 mm) o en cajas de cultivo en forma de pozos. En cualquiera de estas dos condiciones el medio se equilibra en la incubadora por lo menos 2 horas antes de utilizarse (28).

Después de que los ovocitos se colocan en el medio de maduración, se regresa la caja a la incubadora para que éstos inicien su maduración.

Las condiciones ambientales de incubación referentes a tiempo, temperatura, porcentaje de CO_2 y humedad relativa varían de acuerdo a los diversos laboratorios, y éstas se dan a continuación:

Cuadro 8				
CONDICIONES AMBIENTALES DE INCUBACIÓN PARA LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i>				
TIEMPO	TEMPERATURA	ATMÓSFERA DE	HUMEDAD	REFERENCIA
HORAS	°C	CO ₂ EN AIRE	RELATIVA	
		%	%	
21 - 23	38,5	5	100	31
23 - 25	39	5	100	2
22 - 24	38,5	5	99	18
24	39	5	100	11,19,20,28
24	38,5	5	100	30
24	39	5	95	8,14,35
26	39	5	100	14

Se utiliza en menor escala otra atmósfera con el 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂ (1,37), pero De Azambuja ha demostrado que se obtienen más mórulas y blastocistos utilizando una incubadora con una atmósfera de aire con 5% de CO₂ y 20% de O₂ (1).

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fertilización *In vitro* (FIV) del Departamento de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México en Ciudad Universitaria .

3.2. Instalaciones.

Para la manipulación del material biológico fue necesario adecuar las condiciones que tiene el laboratorio de FIV como:

Área séptica: que consta de tres partes que son:

De lavado.

De refrigeración.

De congelación.

Y una sub-área:

De trabajo séptico.

En el área séptica se realizaron actividades de:

- Lavado y secado de material que puede ser reciclado en esta técnica,
- Refrigeración y/o congelación de medios de cultivo y hormonas,
- Aspiración y disección de los ovarios para la obtención de ovocitos y
- Preparación de soluciones no estériles.

Área aséptica: integrada por dos partes que son:

La estéril, localizada dentro del espacio de la campana de flujo laminar.

La no estéril.

En la parte estéril del área aséptica (campana de flujo laminar) se realizaron las actividades de:

- Búsqueda, lavado y colocación de los ovocitos en cajas de cultivo de tejidos antes de introducirse a la incubadora.
- Evaluación de la maduración nuclear de ovocitos después de su incubación, por medio de la tinción con acetorceína.

Las áreas séptica y aséptica se encuentran divididas físicamente entre sí, por una puerta de cristal.

3.3 Equipo y material de laboratorio.

El material que se utilizó en cada paso de esta técnica se incluye en una lista en el Anexo 2:

3.4. Obtención del material biológico.

La fuente de ovocitos para este experimento fueron ovarios de vacas Holstein, cuya edad variaba entre un año y medio hasta ocho, sin problemas de piometra o prolapso uterino, sacrificadas en el rastro municipal de Tlalneplantla, en el Estado de México. El tiempo de transporte fue de aproximadamente 80 minutos desde su obtención hasta el laboratorio.

Los ovarios fueron retirados de su sitio dentro de los 30 minutos posteriores al sacrificio, sin tomar en cuenta el estado del ciclo estral en que se encontraban las vacas. Se escogieron los ovarios que presentaron estructuras foliculares de diferentes tamaños, cada uno de ellos se sujetó con pinzas sin dientes de ratón y se realizó un corte con tijeras lo más cercano al mismo (previamente a cada corte, el material quirúrgico fue alcoholizado). Una vez retirado, el ovario se lavó con Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.9 %) adicionada con 0.1 % de Penicilina G- Sulfato de Estreptomicina (SSFm), a 37 °C para disminuir al máximo la carga bacteriana. Ya lavado se colocó al azar en uno de los dos grupos siguientes:

Grupo 1. Los ovarios fueron transportados al laboratorio en SSFm dentro de una bolsa de plástico con cierre de presión, a una temperatura de 22 a 25 °C.

Grupo 2. Los ovarios fueron transportados en la misma forma, pero mantenidos a una temperatura de 35 a 37 °C.

Previamente se prepararon dos recipientes térmicos (uno para cada grupo), con baños maría que tuvieran los rangos de temperatura correspondientes a cada grupo, en donde se encontraban inmersas las bolsas de plástico con SSFm.

Los rangos de cada grupo se verificaron con un termómetro de mercurio, alcoholizado, antes de que los primeros ovarios fueran colocados en su respectiva bolsa.

3.5. Transporte.

Durante el transporte de ovarios, desde el rastro al laboratorio, con una duración en promedio no mayor de 80 minutos (6,8), se midió la temperatura de la SSFm de cada grupo, para observar si se encontraba dentro del rango correspondiente a su grupo.

Después se midió la temperatura del agua del baño maria. Este procedimiento se realizó aproximadamente cada 20 minutos, no importando el lugar en que se cumpliera éste (metro, transporte colectivo o calle).

3.6. Procesamiento de los ovarios.

En el área séptica del laboratorio, después de medirse la temperatura de la SSFm ésta se decantó y se realizaron dos lavados consecutivos a cada grupo con SSFm estéril, a 25 °C (para el grupo 1) y a 36 ° C (para el grupo 2).

Se trabajó primero con el grupo 2 y posteriormente con el número 1, debido a las condiciones de manejo de temperatura, sometiéndose ambos grupos al mismo procedimiento.

Procedimiento:

A cada ovario se le midieron con un vernier previamente alcoholizado, los folículos visibles y se procedió a la aspiración de los que tenían un diámetro de 3 a 7 mm (10,15). Esto se realizó sólo mientras se adquiría experiencia en la evaluación de los tamaños de los folículos.

3.6.1. Aspiración.

La aspiración se hizo de la siguiente forma: Usando guantes de látex se sujetó suave pero firmemente al ovario. Se puncionó con una aguja hipodérmica del número 18 conectada a una bomba de vacío con una presión negativa de 50 mm de mercurio (11), la parte lateral de cada folículo y se deslizó la punta hasta que penetrara al interior del mismo (cavidad antral). Se tomó todo el líquido folicular posible. Con la misma punta de la aguja se rasparon delicadamente las paredes con movimientos circulares. El líquido folicular

aspirado se depositó en un tubo cónico de 50 ml (4,11,20,21,41), al que se le colocó su tapa de rosca para dejarse en reposo durante 15 minutos (41). Pasado este tiempo las paredes externas del tubo se alcoholizaron y se llevó a la parte estéril del área aséptica del laboratorio.

3.6.2. Disección.

Mientras tanto, los ovarios aspirados fueron diseccionados evitando los folículos de más de 7 mm de diámetro, intentando así obtener la mayor cantidad de ovocitos posibles. La técnica de disección para la obtención de ovocitos es la misma descrita por Vázquez (35) y por Takagi (31), la cual consiste en realizar incisiones longitudinales y transversales en la corteza del ovario a una distancia de 2 mm entre cada una de ellas. Posteriormente las incisiones se lavaron con solución Talp- Hepes usando una jeringa de 30 ml y una aguja hipodérmica del número 16.

El líquido obtenido del lavado de dos a tres ovarios se colectó en una caja de Petri. Posteriormente la base de la caja de Petri se alcoholizó y se llevó dentro del espacio de la campana de flujo laminar para la búsqueda de ovocitos.

3.7 Búsqueda y lavado de ovocitos.

3.7.1. Proceso de aspiración.

En la parte estéril del laboratorio (dentro de la campana de flujo laminar), con una pipeta serológica se colectó un mililitro de sedimento formado en el tubo cónico y se depositó con suaves movimientos ascendentes y descendentes en una caja de Petri que contenía Talp- Hepes, para reducir la posibilidad de que parte del sedimento se quedara

adherido a las paredes de la pipeta y a la vez homogenizarlo con la solución de la caja, para realizar la búsqueda de ovocitos.

3.7.2. Proceso de disección

Dentro del área de la campana de flujo laminar y bajo el microscopio estereoscópico se realizó la búsqueda de ovocitos directamente de las cajas de Petri que se usaron para colectar el líquido de lavado.

La búsqueda de ovocitos de ambos procesos se realizó de la siguiente manera:

La caja de Petri se colocó debajo del objetivo del microscopio estereoscópico (12x), se localizó la esquina superior de la caja, después en forma horizontal se desplazó la caja hasta llegar a la esquina superior derecha, con un ligero movimiento vertical hacia arriba se pasó a otro campo visual y el movimiento horizontal se hizo hacia el lado contrario, de tal forma que toda la caja fue observada.

Cada que un ovocito era localizado, éste se succionó con una pipeta Drummond y se colocó en una caja de Petri de menor tamaño que contenía Talp- HEPES a 37 °C, que se encontraba sobre un cojín térmico a una temperatura de 37 °C, permaneciendo ahí hasta que en todas las cajas de ese grupo se buscaron ovocitos, esto constituyó el primer lavado con Talp- HEPES.

Todos los ovocitos que se colocaron en la caja del primer lavado, usando otra punta Drummond se pasaron a otra caja con Talp- HEPES nueva identificada como "Lavado 2" y éstos a su vez con otra punta Drummond se colocaron en otra caja con la misma solución identificada como "Lavado 3".

Se hizo un cuarto lavado utilizando otra punta para colocar los ovocitos en una caja de Petri con medio de maduración (28).

Durante la búsqueda los ovocitos se clasificaron según De Loos 1989 (20), utilizando solo los ovocitos clasificados en las categorías 1 y 2.

El resto de los ovocitos se eliminó debido a que se ha demostrado que tienen disminuido su potencial para madurar *in vitro*, y porque gran parte de los ovocitos de la categoría 4 degenera bajo condiciones *in vitro* (20).

3.8. Maduración *in vitro*.

Los ovocitos ya lavados se depositaron en cajas de cultivo de tejidos de 4 pozos de poliestireno (Nunc, Dinamarca) que contenían 500 microlitros de medio de maduración modificado por De Loos (Apéndice 2) que fue equilibrado previamente durante dos horas en la incubadora a 39 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de aire y una humedad relativa del 100%.

Los pozos 1 y 2 se identificaron como grupo 1 y los pozos 3 y 4 como grupo 2. Los ovocitos se colocaron en grupos de hasta 30 ovocitos por pozo según el número que existió para cada grupo.

Las cajas se mantuvieron en incubación para que los ovocitos maduraran durante 24 h a una temperatura de 39 °C, con 5% de CO₂ y una humedad relativa del 100% (9,11,19).

Transcurrido este tiempo los ovocitos fueron sacados de la incubadora y se observaron al microscopio estereoscópico. Se contó el número de ovocitos con expansión de las células *cumulus*, de cada uno de los grupos (los ovocitos expandidos se consideran como maduros) (9,11,13).

3.9 TINCIÓN DE OVOCITOS.

Después de evaluar la expansión, se tomó una muestra representativa de cada grupo, se sometió al vortex durante 3 minutos para retirar las células *cumulus* y después se fijaron una solución de ácido acético y etanol (1:3 vol/vol) durante 24 h. Posteriormente, se tiñeron con un colorante de acetorceína al 1% para evaluar la maduración nuclear de estos con un microscopio de contraste de fases (30).

Los ovocitos se clasificaron en 4 tipos, que se describen a continuación:

Tipo 1. Ovocitos que permanecieron en un estadio de vesícula germinal:

Los ovocitos aquí incluidos no iniciaron la maduración, manteniéndose en el mismo grado en que se obtuvieron. Éstos se caracterizan por tener su núcleo prominente y vesicular (vesícula germinal) con poca afinidad a los colorantes específicos para la cromatina. Se considera que estas características morfológicas representan el estado de "arresto" de la meiosis en el que se encuentra el ovocito desde la etapa de diploteno (33)

Tipo 2. Ovocitos que no completaron la maduración hasta metafase II:

En este grupo como su nombre lo indica están comprendidos aquellos ovocitos que reiniciaron la meiosis pero que no la completaron hasta metafase II. Estos ovocitos se caracterizan por la ausencia tanto de vesícula germinal como del primer cuerpo polar (22).

Dentro de este tipo se incluyen a los ovocitos que se encuentran en cualquiera de los estadios de la meiosis I.

Tipo 3. Ovocitos que completaron la maduración hasta metafase II:

En este grupo se incluyen a los ovocitos con extrusión del primer cuerpo polar cuya presencia es indicativa de que el óvulo prosiguió su maduración hasta la metafase II de la meiosis (18,30). Estos ovocitos se consideran maduros.

Tipo 4. Ovocitos que sufrieron degeneración:

Aquí se encuentran los ovocitos con alguna (s) de las siguientes características: vacuolización o fragmentación del ovoplasma, distribución irregular del mismo, membrana plasmática no definida o falta de continuidad de la misma. Estas características se consideran como las indicativas que el ovocito está en vías de degeneración (23).

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El porcentaje de ovocitos expandidos de los dos grupos se evaluó por el método estadístico de prueba de hipótesis y por intervalo de confianza (IC) (5).

El porcentaje de ovocitos madurados y teñidos de los dos grupos, se evaluó por el método estadístico de prueba exacta de Fisher.

Para que éste se realizara se utilizó en el grupo 1 (22 a 25 °C) una muestra de 132 ovocitos de las categorías 1 y 2 (20). Para el grupo 2 (35 a 37°C) una muestra de 142 ovocitos correspondientes a las mismas categorías.

4.- RESULTADOS

4.1 COLECCIÓN DE OVARIOS.

Se utilizaron 26 vacas de raza Holstein con las características requeridas, de las cuales se obtuvieron un total de 52 ovarios para realizar este trabajo, de ellos 9 se descartaron porque no presentaban estructuras foliculares visibles, quedando sólo 43. De este total de ovarios, 17 fueron seleccionados para el grupo 1 y 26 para el grupo 2.

4.2 TRANSPORTE DE OVARIOS.

Se observó que aproximadamente a los 25 minutos del transporte la temperatura empezó a variar en el grupo 2 (35 a 37 °C), por lo tanto cada 20 ó 25 minutos se midió la temperatura realizando la última medición cuando los ovarios llegaron al laboratorio, observándose que:

En el grupo 1, la temperatura de la SSF y del baño maría no varió, estando siempre dentro del rango de 22 a 25 °C.

En el caso del grupo 2, la temperatura de la SSF no rebasó el límite inferior del rango (35°C). Sin embargo, la del baño maría si lo hizo a 34 °C, por tanto se le agregó agua caliente de la siguiente manera: el agua se vaciaba sobre las paredes del termo y con un agitador se movía continua y uniformemente el agua del baño, evitando que el agua hirviendo tocara las paredes de la bolsa que contenía a los ovarios. Esto se hizo hasta que el agua del baño alcanzara el límite superior del rango (37 °C).

4.3 COLECCIÓN DE OVOCITOS.

En el Cuadro 9 se muestran las cantidades de ovocitos totales obtenidos, así como los ovocitos que se encontraron dentro de las categorías usadas para cada uno de los grupos.

Cuadro 9		
CANTIDADES Y PORCENTAJES DE OVOCITOS USADOS EN EL EXPERIMENTO		
GRUPO	1	2
TEMPERATURA	22 A 25 °C	35 A 37 °C
No. DE OVARIOS	17	26
No. DE OVOCITOS	160	245
% DE OVOCITOS / OVARIO	9.41	9.42
No. DE OVOCITOS UTILIZABLES	142	145
% DE OVOCITOS UTILIZABLES / OVARIO	8.35	5.58

4.4 MADURACIÓN

Después de 24 horas de incubación, se evaluó la expansión que presentaron las células *cumulus* de los ovocitos.

En el Cuadro 10 se muestran las proporciones de ovocitos expandidos, obtenidos por los ovarios transportados a una temperatura de 22 a 25 °C y de 35 a 37 °C.

En el mismo cuadro se encuentra el IC del 95% para la diferencia entre las dos proporciones de ovocitos expandidos, así como la prueba de hipótesis para su comparación.

Tanto el IC como la prueba de hipótesis muestran que no existe evidencia suficiente para afirmar que la expansión de ovocitos se vea favorecida por haber transportado los ovarios ya sea en el rango de 22 a 25 °C ó en el de 35 a 37 °C respectivamente.

Cuadro 10		
PORCENTAJES DE OVOCITOS CON EXPANSIÓN DE CÉLULAS CUMULUS		
	GRUPO 1	GRUPO 2
	22 A 25 °C	35 A 37 °C
No. DE OVOCITOS INCUBADOS (n)	142	145
No. DE OVOCITOS CON EXPANSIÓN DE CÉLULAS CUMULUS	137	136
% DE OVOCITOS CON EXPANSIÓN (p)	96.47	93.79
Intervalo de Confianza del 95% para $\pi_1 - \pi_2$	(-0.023, 0.076)	
ESTADÍSTICO Z	1.056	
VALOR P DE LA PRUEBA Z	0.14548	

4.5 EVALUACIÓN DE LA TINCIÓN.

En el Cuadro 11 se muestran los porcentajes y resultados para el total de ovocitos utilizables en el experimento sin importar el grupo:

Cuadro 11. RESULTADOS PARA EL TOTAL DE OVOCITOS DEL EXPERIMENTO		
CLASIFICACIÓN	RESULTADOS	PORCENTAJES
	No.	%
TIPO 1	17.83	6.10
TIPO 2	204.83	71.37
TIPO 3	26.27	9.15
TIPO 4	38.37	13.36

De los ovocitos que expandieron se tiñeron el 24.81% del grupo 1 y el 26.47 % del grupo 2. Durante el proceso de tinción se perdieron 4 ovocitos del grupo 1.

Después de su evaluación bajo el microscopio se obtuvieron los resultados que se muestran en el Cuadro 12:

Cuadro 12 EVALUACIÓN DE LA TINCIÓN						
GRUPO	Clasificación de los ovocitos teñidos: Tipos.				Degenerados	Total
	Maduración Incompleta	Vesícula Germinal	Maduración Completa			
22 a 25 °C	22	2	3		3	30
35 a 37 °C	25	2	3		6	36
Total	47	4	6		9	66

Probabilidad Exacta de Fisher
 $P(X < = 0.027104216) = 0.167118621$

Los resultados indican que no existe evidencia suficiente para afirmar que la transportación de los ovarios, a temperatura ya sea entre 22 a 25 °C o entre 35 a 37

respectivamente, modifique substancialmente la proporción del tipo de ovocitos en forma general. ($P= 0.16712$).

Cabe mencionar que la proporción de ovocitos incompletamente madurados no mostró diferencia estadísticamente significativa entre las dos temperaturas de transportación mencionadas ($P = 0.3305$), comportamiento que de igual forma se observó con los demás tipos de ovocitos analizados ($P > 0.05$).

Sin embargo, se pudo también constatar que de manera independiente a la influencia de la temperatura de transporte, la proporción de ovocitos incompletamente madurados fue significativamente mayor que la de cualquiera de las demás clasificaciones de ovocitos en cada uno de los grupos ($P = 0.000$). Lo anterior se demuestra en el Cuadro 13.

Cuadro 13		
CLASIFICACION DE OVOCITOS POR GRUPO		
CLASIFICACION DE OVOCITOS	Grupo 1	Grupo 2
	22 a 25°C	35 a 37 °C
	PROPORCION	PROPORCION
Maduración incompleta	73.33	69.44
Vesicula germinal	6.67	5.56
Maduración completa	10	8.33
Degenerados	10	16.67
Total	100	100

5.- DISCUSIÓN

De acuerdo a lo observado en este trabajo los rangos de temperatura de transporte utilizados desde el rastro al laboratorio (22 a 25 °C y 35 a 37 °C), no tuvieron diferencia estadística significativa en lo que se refiere a la maduración *in vitro* de los ovocitos. Lo anterior significa que ambos rangos de temperatura pueden ser utilizados, sin que afecten los resultados de la maduración *in vitro*.

Los rangos de temperatura de 22 a 25 °C y de 35 a 37 °C no afectaron significativamente el porcentaje de ovocitos tipo 1. Sobre este hallazgo no se encontró información de ningún tipo en la literatura consultada.

Los rangos de temperatura de 22 a 25 °C y de 35 a 37 °C no afectaron en forma significativa el porcentaje de ovocitos tipo 2, no encontrándose ningún tipo de información al respecto en la literatura consultada. Esta categoría fue significativamente mayor en número que la de cualquiera de los demás tipos. Es posible que uno de los factores para que estos ovocitos no llegaran a completar su maduración fuera que requerían un tiempo de incubación mayor, como el utilizado por Azambuja (1), Madison (21) y Whesthusin (37), aunque Shamsuddin reporta que no hay diferencias significativas en la cantidad de ovocitos madurados si los tiempos de incubación de los mismos son de 20, 24 ó 26 h (28).

Los rangos de temperatura de 22 a 25 °C y de 35 a 37 °C no afectaron de manera significativa el porcentaje de ovocitos tipo 3. En lo que se refiere a la temperatura de 35 a 37°C, esta información coincide con lo reportado por Sekine y colaboradores (27), quienes mencionan que el rango de 35 a 37 °C tiene una influencia positiva en la fertilización *in vitro*, y que un rango de 31 a 34 °C lo tiene en el desarrollo, considerando un tiempo de transporte de 80 minutos. En lo que se refiere al rango de 22 a 25 °C, no se han encontrado diferencias en la etapa de maduración y fertilización, pero en el desarrollo de los

embriones se observa que un mayor porcentaje llegan a la etapa de blastocisto en comparación con temperaturas mayores que este rango (39).

Los rangos de temperatura de 22 a 25 °C y de 35 a 37 °C no afectaron el porcentaje de ovocitos tipo 4. En este caso tampoco se encontró información en la literatura revisada.

Sekine y colaboradores (27) concluyen que la temperatura óptima de transporte de ovarios es en el rango de 34 a 36 °C, cuando son transportados dentro de un tiempo de 80 minutos. Pero de acuerdo a lo encontrado en este trabajo no existe diferencia significativa en la maduración *in vitro*, utilizando cualquiera de estos dos rangos de temperatura (22 a 25 °C y de 35 a 37 °C), empleando un tiempo de transporte similar.

Sin embargo, en este caso se encontró que debido a las condiciones particulares en que se realiza el transporte hacia este laboratorio, el rango de 22 a 25 °C es más fácil de mantener (por ser la temperatura ambiente), además de que no requiere la adición de agua caliente durante los 80 minutos del transporte.

Los porcentajes de maduración obtenidos a partir de las investigaciones realizadas, son inferiores a los encontrados en trabajos similares (1,7,8,27), lo que permite observar que la expansión alcanzada por los ovocitos no se correlacionó con la maduración nuclear y citoplasmática, esto es contrario a lo encontrado por Hunter (13).

También es posible que las diferencias en los resultados obtenidos en esta investigación, puedan deberse a factores propios de este experimento, por ejemplo la raza de las vacas utilizadas. Sekine y colaboradores utilizaron ovarios de vacas Japonesas negras y Holstein Friesian, mientras que en este trabajo solamente se utilizaron ovarios de vacas Holstein. Otro factor posible es la experiencia que se tenga en cada una de las etapas de este proceso (PIVEB), la cual es muy corta en las personas que intervinieron en este trabajo de investigación.

6.- CONCLUSIONES.

1.- Evaluación del efecto de la temperatura de transporte de los ovarios, desde el rastro al laboratorio, en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.

En este estudio, tanto el intervalo de confianza como la prueba de hipótesis muestran que no existe evidencia suficiente para afirmar que la expansión de ovocitos se vea favorecida por haber transportado los ovarios ya sea en el rango de 22 a 25 °C ó en el de 35 a 37 °C respectivamente.

2.- Determinación del rango de temperatura más adecuado y a su vez práctico de mantener, para obtener la mayor proporción de ovocitos madurados *in vitro*.

En este estudio, tanto el intervalo de confianza como la prueba de hipótesis muestran que no existe evidencia suficiente para afirmar que el número de ovocitos madurados *in vitro* se vea favorecida por haber transportado los ovarios ya sea en el rango de 22 a 25 °C ó en el de 35 a 37 °C respectivamente.

Cabe mencionar que la proporción de ovocitos incompletamente madurados no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los dos rangos de temperatura de transportación mencionados ($P=0.3305$), comportamiento que de igual forma se observó con los demás tipos de ovocitos analizados ($P>0.05$).

Sin embargo, se pudo constatar que dentro de ambos grupos de temperatura de transporte, la proporción de ovocitos incompletamente madurados fue significativamente mayor que la de cualquiera de los demás tipos de ovocitos ($P= 0.000$), lo cual podría

atribuirse a efectos aleatorios, considerando que las demás fuentes de variación se controlaron.

3.- Contribución al establecimiento de una metodología aplicable en México.

Debido a todo anterior, es más conveniente que en la práctica los ovarios se transporten durante viajes de aproximadamente 80 minutos a una temperatura de 22 a 25 °C, pues éste rango es más cercano a la temperatura ambiente y por lo tanto resulta más fácil de conservar.

7.- LITERATURA CITADA:

1. Azambuja, R. M. de, Moreno, J. F., Kraemer, D.C. and Westhusin, M.: Effect of gas atmosphere on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, **39**:184 (1993).
2. Bavister, B. D., Rose-Hellenkant, T. A. and Pinyopummintr T.: Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. *Theriogenology*, **37**: 127-146 (1992)
3. Bezar, J., Cogne, Y., Crozet, N., Duchamp, G., Guérin, Y., Magistrini, M., Palmer, E. and Poulin, N.: *In vitro* fertilization in ovine, caprine and equine species. *Ann. Zootech.*, **41**: 353-359 (1992).
4. Castellan, G. W. Fisicoquímica. Segunda edición. *Fondo Educativo Interamericano* S. A. México. 1984.
5. Doménech, M. J. M.: Métodos Estadísticos para la Investigación en Ciencias Humanas. Ed. *Herder*. Barcelona, España. 1975.
6. Fayrer-Hosken, R. A. and Caudle, A. B.: Bovine *in vitro* fertilization: Will the technique be practical?. *Embryo Transfer*, **5**:1-5 (1990).
7. Führer, F., Schellander, K., Mayr, B. and Kalat, M. : Nuclear morphology in growing and fully grown bovine oocytes. 11th International Congress on animal reproduction and artificial insemination 26- 30 Jun. 1988, vol. 3 pag 326. Dublin-Ireland. (1988).
8. Fukui, Y., McGowan, L.T., James, R.W., Pugh, P.A. and Tervit, H.R.: Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **92**:125-131 (1991).
9. Gordon, I. and Lu, K. H.: Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, **33**: 77-87 (1990).
10. Goto, K., Kajihara, Y., Koba, M., Kosaka, S., Nakanishi, Y. and Ogawa, K.: *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, **67**: 2181-2185 (1989).
11. Hawk, H. W., and Wall, R. J.: Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, **41**: 1571-1583 (1994).
12. Hirao, Y., Miyano, T. and Kato, S.: Fertilization of *in vitro* grown mouse oocytes. *Theriogenology*, **34**: 1071-1077 (1990).
13. Hunter, A. G. and Moor, R. M.: Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, **70**:1646-1651 (1987).
14. Kato, H. and Iritani, A.: *In vitro* fertilization in cattle. *Mol Reprod Dev.*, **36**: 229-231 (1993).

15. Kruip, Th. A. M., Pieterse, M. C., Beneden, Th. H. van, Vos, P. L. A. M., Worth, Y.A. and Taverne, M. A. M.: A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *Veterinary Record*, **128**:208-210 (1991).
16. Kruip, Th. A. M. and Dieleman, S. J.: Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Dev.*, **22**: 465-473 (1982).
17. Lambert, R. D., Sirard, M. A., Bernard, C., Beland, R., Riux, J. E., Leclerc, P., Menard, D. P. and Bedoya, M.: In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. *Theriogenology*, **25**: 117-133 (1986).
18. Larocca, C., Kmaid, S. and Calvo, J.: Effect of follicular fluid and estrus cow serum on maturation, fertilization and development of the bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, **39**: 253 (1993).
19. Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Parrish, J. J. and First, N. L.: In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, **31**: 61-74 (1989).
20. Loos, F. De, Vliet, C., Maurik, P. and Kruip, A.M.: Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.*, **24**: 197-204 (1989).
21. Madison, V., Avery, B. and Greve, T.: Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim. Reprod.*, **27**: 1-11 (1992).
22. Michely, G and Schwarze, E.: Compendio de anatomía Veterinaria tomo IV. *Acribia*. Zaragoza, España 1984.
23. Molik, J. and Fulka, J.: Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* **25**:87-97 (1986)
24. Paramio, M. T., Martino, A., Morgas, T., Palomo, M. J. e Izquierdo, D.: Fecundación in vitro de ovocitos foliculares de cabras prepuberes. V Jornadas sobre producción animal. tomo II. Zaragoza, España. 1993. 433-435. Asociación Interprofesional para el desarrollo agrario. Zaragoza, España. 1993.
25. Pieterse, M. C. Vos, P. L. A. N., Wurth, Y.A., Beneden, Th. H. van, Willense, A. H., Taverne, M. A. M. and Kruip, Th. A. M.: Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, **35**: 19-24 (1991).
26. Romo, G. S.: Biotecnología reproductiva: Avances en ganado bovino. *Vet. Mex.*, **24**: 177-184 (1993).
27. Sekine, M. A., Sakurada, T. and Oura, R.: Optimum temperature of ovary transportation for in vitro fertilization of bovine oocytes. *Veterinary Record*, **131**: 372 (1992).
28. Shamsuddin, M., Larsson, B. and Rodríguez-Martínez, H.: Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.*, **31**: 49-60 (1993).

29. Sirard, M. A., Parrish, J. J., Ware, C. B., Leibfried- Rutledge, M. L. and First, N. L.: The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. reprod.*, **39:5** (1988).
30. Sirard, M. A., Coenen, K. and Bilodeau, S.: Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, **37**: 39-57 (1992).
31. Takagi, Y., Mori, K., Takahashi, T., Sugawara, S. and Masaki, J.: Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *J Animal Sci.*, **70**: 1923-1927 (1992).
32. Toyoda, Y. and Naito, K.: IVF in domestic animals. Fertilization in mammals Cap. 24 Ed. *Pleanum Press. New York . USA*. pp. 335-347 (1990).
33. Vanderhyden, B. C. and Armstrong, D. T.: Role of *cumulus* cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. *Biol. Reprod.*, **40**: 720-728 (1989).
34. Vatti, G. Ginecologia y Obstetricia Veterinarias. *UTEHA*. México (1985).
35. Vazquez, J. C., Moreno, J. F., Hanneman, R., Evans, J. W. and Kraemer, D. C.: Evaluation of three techniques for recovery of equine oocytes. Equine Nutrition & Physiology Society, Thirteenth Equine nutrition & physiology symposium proceedings, Jun. 21-23 (1993).
36. Wildt, D. E.: Potential application of IVF technology for species conservation. Fertilization in mammals. Cap. 25. Ed. *Pleanum Press. New York . USA*. pp. 349-364. (1990).
37. Westhusin, M., Moreno, J. F., De Azambuja, R. M., Kraemer, D. C.: Transport and maturation of bovine oocytes in a NON- CO₂ environment. *Biol. Reprod.*, **48** Sup 1: 169 (1993).
38. Wright, R. W. and Bondioli, K. R.: Aspect of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. *J. Anim. Science* **53**: 3 (1981)
39. Yang, N. S., Lu, K. H. and Gordon, I.: *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology.*, **33**: 352 (1990).
40. Yoshida, M.: *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**: 711-718 (1987).
41. Zuelke, K. A. and Brackett, B. G.: Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol. Reprod.*, **43**: 784-787 (1990).

ANEXO 1

Medio de maduración TCM-199 con sales de Earle (40)

Aminoácidos	mg/l	Aminoácidos	mg/l
L- alanina	50.00	L- lisina HCl	70.00
L- arginina HCl	70.00	L- metionina	30.00
L- ac. aspártico	60.00	L- fenilalanina	50.00
L- cisteína	20.00	L- prolina	40.00
L- cistina HCl·H ₂ O	0.110	L- serina	50.00
L- ac. glutámico	150.00	L- treonina	60.00
L- glutamina	100.00	L- triptofano	20.00
Glicina	50.00	L- tirosina	40.00
L- histidina HCl·H ₂ O	21.88	L- hidroxiprolina	10.00
L- isoleucina	40.00	L- valina	50.00
L- leucina	120.00		
Sales inorgánicas	mg/l	Vitaminas	mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	200.00	Biotina	0.010
KCl	400.00	D-Ca pantothenato	0.010
Fe(NO ₃) ₃ ·2H ₂ O	0.72	Choline Chloride	0.500
MgSO ₄ (anhvd)	97.67	Ac. fólico	0.010
NaCl	6.800.00	Inositol	0.050
NaHCO ₃	2.200.00	Niacinamida	0.025
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140.00	Piridoxina HCl	0.025
		Riboflavina	0.010
		Tiamina HCl	0.010

Otros	mg/l
Glucosa	1.000.00
Hipopantina	0.500
Rojo fenol	20.00

Medio de maduración modificado por De Loos:

Medio TCM-199 con sales de Earle suplementado con:

Suero Fetal Bovino 20%.

50µl de Hormona Luteinizante.

50µl de Hormona Folículo Estimulante.

0.1% de Penicilina - Estreptomicina.

pH: 7.4

Anexo 2

EQUIPO Y MATERIAL DE LABORATORIO.

El material que se utilizó en cada paso de la técnica de maduración de ovocitos *in vitro* fue:

Para la obtención de ovarios:

Bata
Guantes de látex.
Tijeras.
Pinzas sin diente de ratón.
SSF a 22-25°C y a 35-37°C.
Termómetro de mercurio.
Bolsas de plástico con cierre hermético.
Agua fría y caliente.
Termos caseros.

2.- Para el transporte de ovarios:

Termos caseros
Agua caliente y fría.
Termómetro de mercurio.
Vaso de unicel.
Agitador de cristal
Alcohol al 70%.

3.- Para la colección de ovocitos:

Agujas hipodérmicas del No. 16 y 18.
Jeringas de 30 ml.
Tubos cónicos de 50 ml con tapa de rosca.
Guantes de látex.
Bomba de vacío.
Hojas estériles de bisturí.
Cajas de Petri.
Vernier.
Alcohol al 70%.
Talp- Hepes.
SSF a 22-25 °C y a 35-37 °C.

4.- Para la búsqueda y lavado de ovocitos:

Microscopio estereoscópico.
Termoplatina.
Pipeta serológica.
Pipetas y puntas Drummond.
Cajas de Petri.
Talp- Hepes.

Medio de maduración.
Alcohol. al 70%.

5.- Para la maduración in vitro:

Incubadora de tejidos.
Cajas de cultivo de cuatro pozos
Pipetas y puntas Drummon.
Microscopio estereoscópico.
Medio de maduración.

6.- Para la tinción de ovocitos:

Microscopio estereoscópico.
Pipetas y puntas Drummond.
Cajas de Petri
Vortex.
Reloj.
Portaobjetos y cubreobjetos.
Micropipeta.
Vaselina
Microscopio de contraste de fases.
Medio de maduración.
Solución salina al 75%.
Fijador (ácido acético) (etanol).
Acetorceina al 1%.

Notas:

- a) dejar que el fijador seque totalmente.
- b) en caso de usar tripsina al 0.30%, para quitar las células del *cumulus*, no dejar más de cuatro minutos, pues los ovocitos se aclaran en exceso y pueden perderse durante la tinción.