



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Agropecuarias
MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

Tema:

“Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero”

**Tesis previa a la obtención del
título de Magister en
Reproducción animal.**

**AUTOR: MVZ. Jhonatan Marcelo Alvarado Ulloa.
CI.:0104864640**
**DIRECTOR: Dr. Manuel Elías Soria Parra Mg.Sc.
CI.:1801620186**

CUENCA, ECUADOR

2017



RESUMEN

El presente trabajo investigativo se realizó en la granja experimental “Irquis”, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, con el objetivo de Evaluar la calidad de ovocitos en bovinos recuperados a partir de dos fuentes: aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU) en ganado criollo y aspiración folicular en ovarios de matadero. Se emplearon 10 novillas criollas cíclicas de 3 a 3,5 CC mantenidas en pastoreo y con suministro de sales minerales; y 200 ovarios de matadero. La recuperación ovocitaria por OPU y por aspiración folicular se realizó con agujas descartables 18G y a una presión de vacío de 90mmHg. Los ovocitos obtenidos fueron clasificados en tres categorías de acuerdo a Hawk & Wall (1994). La morfometría se lo realizó con ayuda de una cámara de alta definición montada sobre un microscopio invertido con lente 10X y equipado con el software AmScope V.3.7. La viabilidad se evaluó con azul tripan y la actividad enzimática con el test de azul de cresil brillante. Para el análisis estadístico se empleó la prueba de Chi-cuadrado y el estadístico “U de Mann Withney” ($P < 0,05$). Los resultados demuestran diferencias significativas para las fuentes de los ovocitos ($P < 0,05$) mientras que para la viabilidad y actividad enzimática no hay diferencias significativas ($P > 0,05$). Se concluyó que las fuentes de recuperación ovocitaria producen diferentes calidades de ovocitos pero con viabilidad y actividad enzimática similar.

Palabras clave: OPU, ASPIRACION FOLICULAR, GANADO CRIOLLO, OVOCITO.



ABSTRACT

This research work was conducted at the experimental farm "Irkis", Faculty of Agricultural Sciences at the University of Cuenca, the aim of this study was to evaluate the quality of oocytes in cattle recovered from two sources: transvaginal follicular aspiration guided by ultrasound (OPU) in native cattle and follicular aspiration in abattoir ovaries. 10 cyclical indigenous heifers from 3 to 3.5 CC maintained on pasture and supply of mineral salts were used; and 200 slaughterhouse ovaries. Oocyte recovery OPU and follicular aspiration was performed with disposable needles 18G and a vacuum pressure of 90 mmHg. The oocytes obtained were classified into three categories according to Hawk & Wall (1994). The morphometry was made using a high definition camera mounted on an inverted lens 10X and equipped with software V.3.7 AmScope microscope. The viability was assessed with trypan blue and enzyme activity with brilliant cresyl blue test (BCB). For statistical analysis the Chi-square and statistical "Mann Whitney" ($P < 0.05$) was used. The results show significant differences for sources of oocytes ($P < 0.05$) while for the viability and enzyme activity no significant differences ($P > 0.05$). It was concluded that oocyte recovery sources produce different qualities but oocyte viability and similar enzyme activity.

Keywords: OPU, FOLLICULAR ASPIRATION, INDIGENOUS CATTLE OOCYTE.



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Objetivo General.....	16
1.2. Objetivos específicos.....	16
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Ovogénesis y folículo-genesis.....	17
2.1.1. Desarrollo prenatal.....	18
2.1.2. Desarrollo posnatal.....	18
2.2. Complejo Cúmulo-oo-cito (COC).....	19
2.3. Recuperación del Complejo Cumulus-Oocito (COC).....	20
2.3.1. Recuperación de ovocitos en material de matadero.....	20
2.3.2. Recuperación en hembras vivas.....	22
2.4. OPU.....	25
2.4.1. Uso de la técnica OPU.....	25
2.4.2. Sistema de la técnica OPU.....	26
2.4.3. Descripción de la técnica.....	26
2.5. Factores que afectan la calidad de los ovocitos.....	27
2.5.1. Edad del animal.....	28
2.5.2. Categoría de los animales y ciclo estral.....	29
2.5.3. Condición nutricional.....	29
2.5.4. Factores animales.....	29
2.5.5. Factores medioambientales.....	30
2.5.6. Técnicas de recuperación ovocitaria.....	30
2.5.7. Tamaño de los ovarios.....	31
2.6. Evaluación de la calidad del Ovocito.....	31
2.6.1. Esquemas de clasificación morfológica.....	32
2.6.2. Diámetro del ovocito.....	34
2.6.3. Viabilidad de los ovocitos.....	35
2.6.4. Actividad Mitocondrial.....	35
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	37



3.1. Materiales.	37
3.1.1. Físicos.	37
3.1.2. Bioquímicos.	37
3.1.3. Biológicos.	37
3.2. Métodos.	37
3.2.1. Ubicación de la investigación.	37
3.2.2. Descripción de las unidades de análisis.	37
3.2.3. Obtención de ovocitos.	38
3.2.4. Obtención de ovocitos en vaconas criollas vivas.	39
3.2.5. Manejo de los Ovocitos.	39
3.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico.	41
3.2.7. Recolección de datos.	41
3.2.8. Tratamientos.	41
3.2.9. Variables de la investigación.	42
CAPITULO IV: RESULTADOS.	44
4.1. Calidad Ovocitaria.	44
4.2. Tamaño y categorización de los ovocitos.	46
4.2.1. Tamaño de los ovocitos.	46
4.2.2. Categorización de los ovocitos.	47
4.3. Viabilidad de ovocitos.	49
4.4. Actividad mitocondrial.	51
CAPITULO V: DISCUSIÓN.	52
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	55
CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	56
ANEXOS.	65



Índice de Tablas

Tabla 1. Frecuencia y porcentaje de ovocitos de acuerdo a su calidad en las dos fuentes.....	44
Tabla 2. Valor promedio y error estándar de la media de parámetros de dimensión de ovocitos medidos en las dos fuentes.....	46
Tabla 3 Categorización de los ovocitos.	47
Tabla 4. Frecuencia y porcentaje de la viabilidad de ovocitos (+/-) de acuerdo a su fuente y calidad.	49
Tabla 5. Frecuencia y porcentaje de ovocitos que reaccionaron a la tinción con BCB de acuerdo a su fuente y calidad.....	51



Índice de Figuras

Figura N° 1. Distribución porcentual de ovocitos de acuerdo a su calidad y su fuente.....	45
Figura N° 2 Distribución de los ovocitos categorizados según la fuente (OPU o camal).....	48
Figura N° 3. Porcentaje de la viabilidad de ovocitos de acuerdo a su fuente y calidad	50



Jhonatan Marcelo Alvarado Ulloa, autor de la tesis “**Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 03 de enero del 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jhonatan Alvarado Ulloa".

Jhonatan Marcelo Alvarado Ulloa

C.I: 0104864640



Jhonatan Marcelo Alvarado Ulloa, autor de la tesis “**Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Magister en Reproducción Animal. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 03 de enero del 2016

Jhonatan Marcelo Alvarado Ulloa

C.I: 0104864640



AGRADECIMIENTOS

A mi padre Marcelo Alvarado Tinoco (+) quien fue una inspiración para culminar los estudios y ser una persona de bien.

A mi madre Isabel Ulloa Ulloa quien supo guiarme y brindarme todo su apoyo durante todo el tiempo de mi carrera profesional.

A mi esposa Carla Peláez quien supo mantener esa fuerza y voluntad en mí para poder realizar una meta más en mi vida.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi Director de tesis el Dr. Manuel Soria Parra por apoyarme en este proyecto de investigación.

Jhonatan Marcelo



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por brindarme la oportunidad de cumplir una meta más en la vida, a mi familia y colegas quienes supieron brindarme un apoyo incondicional para la realización de este peldaño en la vida de un profesional abnegado a su profesión.

A todos mis hermanos y amigos que siempre supieron echar una mano para sobrellevar los problemas que se presentan en la vida.

A mis compañeros que a pesar de las distancias siempre estuvieron pendientes.

Especialmente a mi mujer quien supo apoyarme y seguirá hasta el final con el mejor regalo que me brindará en una etapa más en mi vida ser un padre de familia del cual se lo dedico este trabajo para demostrar un ejemplo de vida en su crecer diario.



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

ATP	Adenosin tri fosfato
BCB	Azul brillante de cresilo
CC	Condición corporal
COC	Complejo Cumulo-Ovocito
EMURPLAG	Empresa municipal de rastro y plaza de ganado.
FIV	Fertilización in vitro
FSH	Hormona folículo estimulante
G6PDH	Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
GCP	Células germinales primordiales
MHz	Mega Herz
MTT	3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium Bromide
mmHg	Milímetros de mercurio
OPU	Ovum Pick-Up
PBS	Suero fetal bovino
PIV	Producción in vitro de embriones
ZP	Zona pelúcida
Mm	Milimicras



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La técnica de la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido para la recuperación de óvulos (OPU) fue desarrollado originalmente para la reproducción asistida en humanos y posteriormente se utiliza en el ganado bovino en los Países Bajos a finales de 1980 (Chaubal, et al. 2006). Durante el desarrollo e innovación tecnológica en la industria ganadera de transferencia de embriones bovinos se han implementado biotecnologías de la reproducción como protocolos de transferencias en vacas donadoras y receptoras, producción de embriones in vitro (PIV) y aspiración folicular por la técnica de Ovum Pick Up (OPU) y recuperación de ovocitos en ovarios de animales en diferentes estados de ciclo estral que han muerto inesperadamente obteniendo una fuente abundante de ovocitos que pueden ser madurados, criopreservados, fertilizados y cultivados in vitro alcanzando altos estados de desarrollo embrionario (Karadjole, et al. 2010).

La OPU es una biotecnología que ofrece un método manejable de recuperación de ovocitos en vacas por vía transvaginal guiado por ultrasonografía, para posteriormente madurar y llegar a la fertilización in vitro (FIV) (Sasamoto, et al. 2003) (Manik , Singla and Palta 2003). Esta técnica se ha aplicado en varios momentos del ciclo estral de vacas tipo lechero y carne para su análisis en cantidad y calidad de ovocitos (Petyim, et al. 2003); también se ha realizado estudios puncionando varias veces por semana evaluando el comportamiento en la calidad y cantidad de ovocitos (Petyim, et al. 2003) (Ding, et al. 2008), se han estudiado diferentes tipos de agujas variando en su grosor y longitud (Sasamoto, et al. 2003), y finalmente niveles de presión (mm/Hg) de vacío que utilizan desde 50 a 100 mm/Hg (Boni 2012).

Además de la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU), también se han implementado procedimientos biotecnológicos a bovinos que han muerto inesperadamente y que tiene alto valor genético, recuperando gametas por aspiración folicular en ovarios de vacas post-mortem. También se han obtenido ovocitos por corte de la superficie del ovario o por aspiración ayudada por transiluminación (Gordon 2003).



En las diferentes alternativas de recuperación ovocitarias descritas anteriormente se pueden obtener diferente calidad de ovocitos, desde calidad I con capas de células de cúmulus expandidos hasta calidad IV sin células de la granulosa, solamente la presencia de la teca externa; siendo los mejores y viables para PIV los de calidad I y II (Rodríguez 2013).

Todas estas técnicas han sido empleadas para la expansión genética en muchas razas bovinas sobre todo de carácter lechero, no obstante también se han empleado en razas bovinas en peligro de extinción como son la Rubia Gallega o la Murciano levantina en España (Poto, et al. 2013), así también en Colombia se ha trabajado en la raza Romosinuano; sin embargo, en el Ecuador poco o casi nada se ha trabajado estas biotecnologías en hembras de raza criolla o nativas de los Andes por lo que se desconoce si su comportamiento es diferente en cuanto a calidad, viabilidad y cantidad de ovocitos.

La recuperación repetida de ovocitos mediante OPU permite obtener la mayor descendencia posible de animales con alto valor genético deseado y acelerar los procesos de selección y mejora animal (vía paterna y materna) a la vez que supone una fuente extraordinaria de ovocitos de ganado de razas en peligro de extinción en nuestro caso la raza criolla nativa de los andes y formar bancos de germoplasma para la conservación de las especies criollas consideradas patrimonios genéticos (Poto, et al. 2013). En ambas técnicas de aspiración folicular (OPU guiada por ultrasonografía en hembras vivas y aspiración folicular en ovarios de matadero), se puede recuperar ovocitos de calidad I y II (Chaubal, et al. 2006) (Rodríguez 2013).

La eficiencia de las técnicas de recuperación ovocitaria depende del tamaño de los folículos aspirados siendo ideal emplear los que se encuentren sobre los 6mm por permitir obtener ovocitos de mejor calidad (Lonergan, et al. 1994) y no mayores a 8mm de diámetro, permitiendo evitar incorporar a los programas de producción in vitro de embriones, ovocitos en estado de atresia (Ferré and Cattaneo 2013).



Con este antecedente fue justificable la realización de este trabajo investigativo tratando de obtener también ovocitos de buena calidad empleando técnicas de recuperación ovocitaria y evaluados con tinciones supravitales para determinar la actividad mitocondrial como es el test del azul brillante de cresilo (BCB) y el azul de tripán mediante permeabilidad de la membrana celular determina la viabilidad del ovocito para una selección previa a una maduración in vitro en ganado criollo nativo de los Andes.



1.1. Objetivo General.

- Evaluar la calidad de ovocitos bovinos recuperados a partir de dos fuentes: aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU) en ganado criollo y aspiración folicular en ovarios de matadero.

1.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar y comparar la calidad de ovocitos obtenidos a partir de dos fuentes



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ovogénesis y folículogenesis.

Los ovocitos se originan como células germinales primordiales (CGP) del endodermo del saco vitelino embrionario, migran por movimientos ameboides a través del mesenterio dorsal del intestino posterior a la cresta gonadal alrededor del día 35 de gestación en los bovinos. Las CGPs están sometidas a un número limitado de divisiones mitóticas durante la migración hasta llegar a la cresta gonadal. Estas células ingresan a la cresta gonadal a través de su epitelio superficial, durante este proceso cesan las divisiones mitóticas y forman cordones de células germinales encerrados por células epiteliales; estos cordones están delimitados por las células mesenquimales formando una lámina basal dando origen a las denominadas oogonias (Adams, et al. 2008) (Araujo, et al. 2014).

La meiosis de la oogonia (transición al primer oocito) inicia por el día 75-80 de gestación en los bovinos y la primera división mitótica no continúa más allá de la etapa de paquiteno de la profase I, momento en que los cromosomas son des-condensados pero son contenidos dentro de la membrana nuclear por la vesícula germinal. Por lo que una sola capa de células epiteliales aplanadas de los cordones de células germinales condensadas alrededor de la gran mayoría de ovocitos sobrevivientes se los encierra para formar los folículos primordiales. Los ovocitos que no han sido encerrados por las células epiteliales se degeneran. La iniciación del desarrollo folicular (activación) inicia con la transformación de las células planas de la pre-granulosa del folículo primordial a una simple capa de células cuboidales granulosa (folículo primario). La proliferación de las células de la granulosa resulta en un incremento de dos a seis capas alrededor del oocito (folículo secundario), a más de seis capas de células granulosa y un antro lleno de líquido (folículo terciario o antral) (Adams, et al. 2008) (Lliteras and Chong 2009) (Rodgers and Irving 2010)



2.1.1. Desarrollo prenatal

El desarrollo de los folículos y los ovocitos comienzan durante la etapa fetal. La dotación completa de ovocitos presentes en el animal adulto se origina de las células germinales primordiales, las mismas que migrarán hasta la cresta gonadal (futuro ovario) para dar lugar a las ovogonias u oogonias (Rodríguez 2013).

Una vez completada la diferenciación del ovario seguido de la formación de las oogonias, estas empiezan a dividirse meióticamente hasta llegar al cuarto estadio de la profase I en donde se detiene la división meiótica, momento en que la oogonia se transforma en ovocitos primarios los mismos que muestran una sensibilidad extrema por lo que una gran parte de ellos degenera. El número de ovocitos formados durante el desarrollo fetal constituye el número máximo disponible en la hembra a lo largo de toda su vida reproductiva y van a permanecer como ovocitos primarios hasta que la hembra alcance la pubertad (Rodríguez 2013) (Filipiak, Viqueira and Bielli 2016). El número de ovocitos morfológicamente saludable en los ovarios de los mamíferos es variable al nacimiento, en el ganado es aproximadamente de 14 mil a 250 mil, además el número de folículos primordiales decrece rápidamente durante la vejez, sin ser remplazado (Ireland, et al. 2008).

2.1.2. Desarrollo posnatal

Las hembras se caracterizan por una variación extrema en el número de ovocitos yendo desde 0 (esterilidad) a miles de ellas. Variación que se mantiene hasta a lo largo del desarrollo posterior del ovocito y de la vida del animal. Se ha descrito que los folículos primordiales permanecen estables hasta el cuarto año de vida disminuyendo gradualmente hasta llegar a 0 a los 15 o 20 años (Rodríguez 2013).

Los ovocitos de los mamíferos se mantienen quiescentes, alojados en los folículos primordiales y que al nacimiento ya tienen una reserva definida. La reserva folicular es determinante de la vida reproductiva de las hembras. En los bovinos de un máximo



de casi tres millones de folículos primordiales, el 90% se perderá por degeneración en las divisiones meióticas iniciales, quedando al nacimiento un número aproximado de 135 mil folículos primordiales (Filipiak, Viqueira and Bielli 2016).

Las células germinales (ovocitos) alojadas en los folículos primordiales permanecen numerosas en los ovarios de hasta 180 días de edad y declinan rápidamente en número hasta la pubertad y luego de ella. Se sabe que en los bovinos menos del 1% de los folículos primordiales que crecen completan la maduración final (Filipiak, Viqueira and Bielli 2016).

2.2. Complejo Cúmulos-ovocito (COC).

El ovocito es la célula más grande de los mamíferos y está rodeada por la zona pelúcida (ZP) y por varias capas de células de la granulosa formando el complejo cúmulos ovocito o COC (Cumulus Oophurus Complexes) (Lliteras and Chong 2009) Los COCs se expanden después de la ovulación debido al depósito de una matriz proteoglicana, siendo el ácido hialurónico el mayor carbohidrato en esta matriz muco-elástica (Van Soom, et al. 2002).

Tanto las células de la granulosa como el ovocito están interrelacionado y con una comunicación bidireccional. Una interrelación compleja de factores regulatorios gobiernan el desarrollo de ambas células: granulosa y ovocito, siendo esencial no solamente para el desarrollo del ovocito sino también para el desarrollo folicular, iniciando con una cohorte de folículos primordiales hasta llegar a la ovulación (Eppig 2001) (Sutton, Gilchrist and Thompson 2003).

El COC es muy importante tanto en la fertilización in vivo como in vitro. En el bovino, las células del cumulus se expanden hasta 10 horas después de la ovulación, y se sabe que los ovocitos bovinos libres de las células del cumulus, quirúrgicamente colectados del oviducto varias horas después de una súper-ovulación son menos fertilizables. Al realizar fertilización in vitro en ovocitos bovinos, la eliminación de las células del cumulus antes de este proceso, disminuye la penetración espermática;



además, se ha podido demostrar que la presencia de las células del cúmulo alrededor del ovocito en especies no dependientes de estas células para la fertilización in vitro, mejora las tasas de fertilización (Van Soom, et al. 2002).

2.3. Recuperación del Complejo Cumulus-Oocito (COC)

La técnica de recuperación varía según el momento en que se vaya a recolectar (pre o pos-ovulatorio) y si se va a obtener de animales faenados (ovarios de matadero) o vivos una sola vez (ovariectomía) o varias veces (Laparoscopia, u OPU) (Gordon 2003) (Herradón, et al. 2007). Reportes sugieren que el método de recuperación ovocitaria por corte ovárico permite obtener un mayor número de ovocitos en comparación con la aspiración folicular (Vasquez, et al. 2015), aunque con igual calidad entre ambas técnicas. (Benavides, Huanca and Quintanilla 2015).

Los métodos adoptados para la recuperación de ovocitos para la producción de embriones difieren según su fuente, si estos proceden de ovarios de matadero recibirán cierto tratamiento y si provienen de animales vivos recibirán un tratamiento diferente antes de proceder a la maduración ovocitaria (Gordon 2003).

2.3.1. Recuperación de ovocitos en material de matadero

Para la producción de embriones empleando ovocitos de ovarios de matadero se desarrollaron métodos para obtener grandes cantidades y de muy buena calidad. La recuperación ovocitaria usualmente se la realiza por aislamiento, disección, aspiración o cortes de los folículos presentes en los ovarios de matadero (Gordon 2003). Sin embargo, a pesar del potencial que tienen los ovarios de producir ovocitos, la recuperación de ovocitos de matadero es muy limitada e irrepetible (Boni 2012). Los ovocitos obtenidos por este método no solamente se puede emplear en la producción in vitro de embriones, sino que también puede emplearse en animales de zoológico (El-Raey and Nagai 2014). Cuando los ovarios llegan al laboratorio son lavados con solución salina, suero fisiológico, alcohol y antibióticos (Gonella, et al. 2013). A continuación se describen las diferentes técnicas empleadas:



2.3.1.1. Disección folicular

Para esta técnica de obtención de ovocitos, según Gordon (2003), se requiere seleccionar ovarios que presenten folículos entre 2 y 8mm. Para la recuperación ovocitaria se requiere la disección de los folículos antrales intactos seguidos de una ruptura cuidadosa y controlada de los folículos sugeridos permitiendo obtener ovocitos morfológicamente aceptables con una mínima disrupción de las células del cumulus. Este método tiene como ventaja la identificación de folículos no atrésicos (folículos secundarios, preovulatorios) (Garcés, et al. 1999).

2.3.1.2. Cortes ováricos

La técnica de cortes o slicing ovárico se puede aplicar directamente sobre los ovarios o aplicarla después de completar una aspiración pudiendo obtenerse el triple de ovocitos con relación a la técnica de aspiración folicular. En varias investigaciones se pudo concluir que esta técnica fue el mejor método para obtener grandes cantidades de ovocitos de ovarios de matadero, debido a que al cortar transversalmente el ovario no solo se obtienen las ovocitos de la superficie, sino que también se obtienen los ovocitos presentes en la sección cortical (Crocomo, et al. 2012).

2.3.1.3. Aspiración folicular

La obtención de los ovocitos por aspiración de los folículos antrales es la técnica mas empleada en la recuperación ovocitaria en ovarios de matadero; sin embargo, se sabe que de todos los folículos puncionados sólo se recupera el 30 o 60% de ovocitos. La ventaja de la absorción folicular se basa en la velocidad y la facilidad operacional, factor particularmente importante en una unidad comercial de producción de embriones. La aspiración folicular se la puede realizar con agujas 18 a 22g empatadas en jeringas de 3 o 10ml (Gonella, et al. 2013); también se emplean agujas de calibre 16 o 19g unidas a un sistema de vacío con una presión de 75 a 100mmHg (Gordon



2003) (Sasamoto, et al. 2003), otros investigadores han obtenido buenos resultados empleando una presión de 250mmHg (Boni 2012).

2.3.1.4. Aspiración ovárica ayudada por transiluminación

Este método asocia la aspiración folicular comúnmente conocida y el empleo de la luz guiada a través de una barra de plexiglás insertado en el *hilus* del ovario. Esta técnica permite iluminar no solo los folículos presentes en la superficie del ovario, sino también los presentes en la corteza del ovario, pudiendo aumentar el número de ovocitos colectados hasta un 50% por ovario. Además, los ovocitos obtenidos por esta técnica muestran un eficiente desarrollo in vitro (Arav 2001).

2.3.2. Recuperación en hembras vivas

La producción de embriones por las técnicas de súper-ovulación convencional conlleva a obtener menos de 100 embriones transferibles durante toda la vida de una vaca, a pesar de que puede haber 100.000 ovocitos presentes en los ovarios; si más de estos ovocitos se pudieran transformar en embriones, se podría generar un impacto considerable los diferentes programas de cría de ganado vacuno (Gordon 2003).

Los primeros reportes en la recuperación de ovocitos bovinos de animales vivos datan de la década de 1980. Los esfuerzos realizados se guiaron a obtener ovocitos madurados in vivo y recuperados por endoscopia con abordaje desde la fosa paralumbar bajo anestesia local, siendo este en un método invasivo (Gonella, et al. 2013).

La recuperación de ovocitos in vivo para la producción in vitro de embriones es tan versátil que puede ser aplicada a donadoras de todas las edades desde terneras de dos meses de vida hasta vacas de edad avanzada, en donadoras secas o lactantes y aun en vacas preñadas después de los tres o cuatro meses de gestación, sin interferir con el estado fisiológico de las donadoras y sin requerimiento de estimulación hormonal (Galli, et al. 2001) (Alvarado, et al. 2016).





2.3.2.1. Método laparoscópico de aspiración folicular.

El método laparoscópico de recuperación ovocitaria permite obtener ovocitos de los folículos pre-ovulatorios en crecimiento; sin embargo, esta técnica es considerada como invasiva (Gonella, et al. 2013). A pesar que esta técnica permite una clara visión de la superficie ovárica, no permite visualizar la cohorte de folículos en crecimiento por debajo de la superficie ovárica. Los trabajos iniciales de recuperación ovocitaria por vía laparoscópica se los realizaba por abordaje de la fosa paralumbar; sin embargo, estudios posteriores pudieron demostrar que era posible recuperar ovocitos laparoscópicamente por vía vaginal, aunque la técnica fue desarrollada para examinar los órganos reproductivos internos de la vaca a través del fondo de vagina (Gordon 2003). Estos hechos fueron la base para desarrollar las técnicas de diagnóstico y recuperación ovocitaria por ultrasonografía. En la actualidad la el método de aspiración folicular laparoscópica está siendo aun empleada en la especie ovina (Crocomo, et al. 2012) (Padilha and Russiano 2012)

2.3.2.2. Método ultrasónico de aspiración folicular.

Al no visualizar la cohorte de folículos en crecimiento, investigadores se apoyaron en el uso de la ultrasonografía permitiendo desarrollar una nueva técnica de recuperación de ovocitos denominada Aspiración Folicular Guiada por Ultrasonografía (Ovum pick-up "OPU"), que resultó menos invasiva, generando menos estrés y de fácilmente adaptación a la aplicación práctica en el campo de mejor manera que otros métodos (Gordon 2003). Además, se demostró que la técnica era repetitiva y sin riesgo de alterar la salud del animal y la actividad reproductiva (Boni 2012) (Corredor and Páez 2012). El gran mejoramiento que tubo la técnica fue el remplazo de la larga aguja hipodérmica de acero inoxidable por una corta, descartable y estandarizada aguja estéril, reemplazable entre donadora y donadora (Van Wagtendonk 2006). En la siguiente sección se estudiará con mayor detalle la técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía u OPU.



2.4. OPU

La técnica de la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido para la recuperación de óvulos denominada OPU (Ovum pick-up) fue desarrollado originalmente para la reproducción asistida en humanos y posteriormente se utiliza en el ganado bovino en los Países Bajos a finales de 1980 (Chaubal, et al. 2006) (Oikawa, Itahashi and Numabe 2016). Comparada con la recuperación ovocitaria por laparoscopia, esta técnica resultó ser menos invasiva pudiendo realizar varias sesiones sin afectar el ciclo estral de la hembra efectuándose sin ningún problema hasta dos veces por semana sin causar alteración del ciclo en hembras con o sin estimulación hormonal (Boni 2012). Es necesario que antes de iniciar el proceso de colecta el animal sea sedado y anestesiado (anestesia epidural) (Galli, et al. 2001).

Después del desarrollo de la técnica OPU en bovinos, se realizaron mejoras para incrementar su uso. Estos avances enfocaron factores técnicos y biológicos; considerando dentro de los factores técnicos fueron incluidos tanto la geometría de las agujas y la presión de vacío reduciendo el número de ovocitos desnudos aunque sin mejorar la cantidad de ovocitos aspirados. Los factores biológicos que también permitieron mejoras en la aspiración folicular incluyeron las donadoras, estimulación hormonal, tiempo y frecuencia de sesiones de aspiración, operadores (Van Wagtendonk 2006).

2.4.1. Uso de la técnica OPU

La OPU es una fuente estable de obtención de ovocitos en aquellos animales que presenten problemas reproductivos, animales viejos, de alto valor genético que estén vacías. Esta técnica también se emplea para obtener ovocitos de hembras prepúberes desde un mes hasta tres meses de nacidas disminuyendo el intervalo generacional (Boni 2012) (Galli, et al. 2001).



La OPU incrementa significativamente el número de embriones transferibles aumentando también el número de preñeces vaca/año, resultado obtenido de la reutilización de donantes de ovocitos, intervalos cortos comparados con la superovulación o con la utilización de ovarios de matadero. La OPU se realiza en cualquier momento del ciclo e incluso durante el inicio de la gestación; sin embargo, la fase de reclutamiento que se da al inicio de una onda folicular es el momento más adecuado (Corredor and Páez 2012).

Con esta técnica de aspiración folicular se puede realizar hasta dos sesiones semanales por un periodo de tres meses sin afectar el ciclo estral. Se puede obtener entre 4 ovocitos/vaca/sesión cuando no se estimula hormonalmente, hasta más de 10 ovocitos/vaca/sesión cuando es estimulada (Gordon 2003) (Sendag, et al. 2008) (Chasombat, et al. 2013).

2.4.2. Sistema de la técnica OPU.

Un sistema de aspiración folicular guiado por ultrasonografía está compuesto por un ecógrafo con transductor, una bomba de aspiración y una aguja, además posee un sistema de guía que es conectado a un recipiente de recolección y una sonda cuyo diseño posibilita la manipulación de la aguja de punción desde el exterior así como poder ser visualizada para penetrar los folículos ubicados cerca del transductor (Corredor and Páez 2012)

2.4.3. Descripción de la técnica.

La técnica aspiración folicular mediante OPU se realiza ubicando la cabeza de transductor inmediatamente caudal al cervix y según el ovario a puncionar se colocará a la derecha o la izquierda. El dispositivo se manipula desde el exterior de la vaca con una mano mientras que la otra mano es introducida en el recto para fijar el ovario contra el transductor visualizándose el ovario y los folículos en la imagen ecográfica, una vez fijado el ovario, la aguja es visualizada en el sector y con movimientos suaves



y cuidadosos es perforada la pared vaginal y los folículos, cuyo contenido es aspirado por la bomba de vacío y recolectados (Corredor and Páez 2012).

Se sabe que el intervalo entre sesiones de OPU influencia tanto en la calidad como en la cantidad de ovocitos recuperados. La longitud del periodo entre dos sesiones afecta significativamente la tasa de producción de embriones. Cuando el intervalo de días entre una sesión y otra es de siete días, se puede obtener una mayor cantidad de ovocitos pero de menor calidad; no obstante, al realizar las colectas de ovocitos cada tres días se obtienen un menor número de ovocitos pero de mucha mejor calidad. Entonces, cuando se remueve los folículos $>2-3\text{mm}$ se induce el desarrollo de folículos de 2-3mm en los días posteriores, y con lo anotado anteriormente se pudo definir que los folículos dominantes ejercen un efecto negativo sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos de folículos pequeños. Luego de una sesión de OPU, el folículo dominante aparecerá tres días después, por lo que el intervalo de sesiones sería de dos días; aunque, por lo general se trabaja con esquemas de dos sesiones por semana a intervalos de tres a cuatro días, o a intervalos de dos a cinco días (Merton, et al. 2003)

Se ha reportado un efecto positivo de la pre-estimulación ovárica con la hormona folículo-estimulante (FSH) sobre el desarrollo competente de los ovocitos antes de la sesión de OPU. Se estima que el periodo óptimo entre la pre-estimulación con FSH y la sesión de OPU es de 48 horas. Además, con la pre-estimulación hormonal se puede obtener hasta 13 ovocitos por sesión (Merton, et al. 2003) (Gordon 2003).

2.5. Factores que afectan la calidad de los ovocitos

Existen muchos factores que influyen tanto la calidad como la cantidad de los ovocitos. Algunas características de los ovocitos de calidad se pueden apreciar inmediatamente por estar ligada con la competencia de los ovocitos, pero hay otras características que no se pueden apreciar hasta la fertilización in vitro, luego de que los ovocitos hayan sido sometidos a un proceso de maduración (Gordon 2003). A



continuación se describen algunos de los factores que consideramos de importancia y que afectan la calidad del ovocito.

2.5.1. Edad del animal.

Si bien es posible obtener ovocitos de animales muy jóvenes o muy viejos, no todos los ovocitos se comportan de la misma manera al momento de la maduración in vitro, estudios han demostrado que los ovocitos provenientes de terneras requieren una mayor atención en cuanto a sustratos empleados para su maduración (Gordon 2003). Los ovocitos obtenidos de hembras pre-púberes resultan ser menos competentes que su contraparte adulta (Mermillod, et al. 2008). Las tasas de viabilidad de los ovocitos obtenidos de hembras pre-púberes son bajas comparadas con las que se pueden obtener de los ovocitos provenientes de animales de mayor edad (vaconas y vacas) debido a que estos ovocitos los de las hembras pre-púberes son mas pequeños en diámetro, metabolizan la glutamina y el piruvato a una tasa más baja, muestran una declinación temprana en la síntesis de proteína, contienen más microvellocidades sobre la superficie celular, mayor cantidad de vesículas endocíticas y menos mitocondrias (Moussa, et al. 2015). Así mismo, se obtuvo diferencias en el desarrollo potencial en los ovocitos recuperados de vaconas con respecto a los obtenidos de vacas adultas (Rizos, et al. 2005).

Del mismo modo, la vejez está relacionada con la declinación de la fertilidad en muchas de las especies de mamíferos, en bovinos se observa a partir de los 13 años de edad. La vejez maternal disminuye las tasas de fertilización y clivaje, y esta relacionada con cambios foliculares y endócrinos. La vejez reproductiva en el ganado está asociada con una elevada circulación de gonadotropinas lo que reduce la concentración de hormonas esteroideas, además se reclutan folículos menores a 4-5mm por onda folicular; la vejez de la hembra también está relacionada con la disfunción mitocondrial (Moussa, et al. 2015).



2.5.2. Categoría de los animales y ciclo estral.

Las observaciones realizadas entre categorías de animales difieren ampliamente entre ganado de carne y de leche. Al cotejar resultados obtenidos entre hembras de la misma categoría pero con diferente finalidad, se pudo observar que los individuos criados como animales de remplazo generan mejores tasas de recuperación ovocitaria comparado con los animales que han sido sometidos a un proceso de ceba), además al realizar estudios entre vacas y hembras púberes, ambas categorías de animales respondieron de similar manera. Investigaciones han establecido que la fase del ciclo estral puede influenciar el potencial desarrollo de los ovocitos y la producción in vitro de embriones (Machatková, et al. 1996); además, cuando los ovarios se encuentran bajo la influencia de un cuerpo lúteo (fase luteal) se puede recuperar ovocitos de muy buena calidad; así mismo, los ovocitos obtenidos de donadoras que se encuentren entre los días 14-16 del ciclo producen una mayor cantidad de blastocistos (Gordon 2003) (Reis, et al. 2006).

2.5.3. Condición nutricional

La nutrición de la hembra bovina afecta la competencia de desarrollo de los ovocitos y embriones. Los cambios en las dietas generan un rápido cambio en el microambiente ovocitario afectando los mecanismos de la función y performance reproductiva como el metabolismo de las proteínas, biosíntesis del ácido ribonucleico y oxidación de los ácidos grasos (Moussa, et al. 2015); dietas que generen altas cantidades de amoníaco circulante en el plasma, afectan la producción de ovocitos (Gordon 2003).

2.5.4. Factores animales

De acuerdo a estudios realizador por (Snijders, et al. 2000), el mérito genético de las vacas afectan la calidad de los ovocitos. Vacas con alto mérito genético producen ovocitos de más baja calidad que las vacas con merito genético medio. Adicionalmente, la cantidad de folículos antrales en la descendencia está influenciada



por el estatus lactacional y la calidad de la leche, pero no es afectada por la producción de leche (Walsh, Mossa, et al. 2014).

La calidad y cantidad de ovocitos bovinos también se ve afectada por el tipo de ganado, es así que en animales procedentes del *Bos taurus* las tasas de fertilización son menores que en las hembras procedentes del *Bos indicus* (Hansen, et al. 2001). Así mismo, el *Bos indicus* puede generar el doble de la cantidad de ovocitos viables comparado con el *Bos Taurus* (Evans, et al. 2012)

2.5.5. Factores medioambientales.

El estrés calórico afecta grandemente el performance productivo y reproductivo de los bovinos. Investigaciones realizadas determinaron que en el trópico y en las estaciones calurosas, la calidad de los ovocitos disminuye en vacas de origen europeo comparadas con las de origen índico (Hansen, et al. 2001); otros resultados indican que el desarrollo de los ovocitos es sensible a la temperatura (De Rensis and Scaramuzzi 2003).

2.5.6. Técnicas de recuperación ovocitaria

Las tasas de recuperación de ovocitos así como la calidad de los mismos dependen de la técnica empleada. La aspiración folicular en ovarios de matadero constituye el método mas empleado en los laboratorios, siendo el principal inconveniente la presión de aspiración pudiendo dañar físicamente las células del cúmulus, así también reduce la cantidad de ovocitos obtenidos porque solo se puede recuperar el 50 o 60% de ellos. Se estima que con el empleo de una aguja de calibre 17G y una presión de vacío de 55mmHg se obtienen un mayor número de ovocitos viables (Rodríguez 2013).

Como segunda opción se encuentra la técnica de *slicing*, cuya ventaja es obtener el mayor número de ovocitos tanto de la parte superficial del ovario como del estroma cortical del ovario, aunque con la desventaja de que esta técnica genera mayores riesgos de contaminación por dejar grandes cantidades de residuos (Arav 2001).



En cuanto a las técnicas empleadas para obtener ovocitos de animales vivos, la técnica más empleada y que mostrados resultados favorables es la OPU, la cual está sujeta a la regulación de aspiración (presión), diámetro de las agujas y realizarlo durante la fase de crecimiento de una onda folicular (etapa de reclutamiento) (Rodríguez 2013) (Benavides, Huanca and Quintanilla 2015).

2.5.7. Tamaño de los ovarios

La cantidad de ovocitos recuperados está correlacionado positivamente con el tamaño y peso del ovario (Kouamo, et al. 2014). En estudios realizados se pudo determinar que las vacas adultas jóvenes con un recuento de folículos antrales bajo tiene un 60% de ovarios pequeños, 80% de folículos y ovocitos menos saludables morfológicamente y 45% menos de folículos y ovocitos saludables por gramo de ovario demostrando que el tamaño de las reservas ováricas de ovocitos es dramáticamente inferior en hembras jóvenes con un bajo conteo de folículos antrales comparado con las hembras que presentan un conteo de folículos antrales alto (Ireland, et al. 2011).

2.6. Evaluación de la calidad del Ovocito

Los resultados en cuanto a maduración in vitro de los ovocitos se ven afectados ampliamente por la reducida competencia para el desarrollo del ovocito, el tipo de ovocito obtenido mediante las diferentes técnicas de recuperación ovocitaria; y, la población heterogénea de los ovocitos obtenidos de los folículos (El-Raey and Nagai 2014).

Se sabe que las células del cumulus que rodean al ovocito tienen un rol esencial no solamente en la maduración nuclear, sino también en la maduración citoplasmática lo cual es necesario para la formación pronuclear masculina (Crocomo, et al. 2012) (El-Raey and Nagai 2014) (Gonella, et al. 2013) (Karadjole, et al. 2010) (Van Soom, et al. 2002) (Sasamoto, et al. 2003). En vista de esto es necesario clasificar a los ovocitos



obtenidos para poder obtener resultados favorables durante la maduración y posterior fertilización in vitro.

2.6.1. Esquemas de clasificación morfológica

El potencial de maduración nuclear y citoplasmática del ovocito está determinado ampliamente por las características del folículo de donde se los obtuvo; es así que, los ovocitos provenientes de folículos mayores a 8mm o menores de 2mm no son aptos para la maduración in vitro (Gonella, et al. 2013).

Luego de definir los folículos a ser incluidos en los programas de recuperación ovocitaria, hay que clasificar los ovocitos obtenidos, morfológicamente los ovocitos con mayor viabilidad deben presentar homogeneidad del citoplasma con granulaciones finas, color marrón y envueltos por varias capas compactas de células de cumulus (Gonella, et al. 2013) (Hawk and Wall 1994). Gordon (2003) describe que existe varios esquemas de clasificación de los ovocitos obtenidos; sin embargo, todos los esquemas de clasificación se basan en la apreciación visual subjetiva del personal de laboratorio pudiendo variar entre la persona que clasifica y entre laboratorios.

(Leibfried and Firts 1979) desarrollaron un sistema de clasificación en ovocitos en una escala de 1 a 4, considerando las características del cúmulus y del citoplasma del ovocito. Este sistema es el mayormente empleado en los laboratorios de producción de embriones in vitro (Gonella, et al. 2013). Las características de este sistema se describen a continuación:

- **Calidad 1:** cumulus compacto presente, conteniendo más de tres capas de células. Citoplasma con granulaciones finas y homogéneas, zona pelúcida llena, completa y de coloración marrón (Gonella, et al. 2013).
- **Calidad 2:** cumulus compacto parcialmente presente con menos de 3 capas de células. Citoplasma con granulaciones distribuidas heterogéneamente, pudiendo estar mas concentradas en el centro y más distribuidas en la periferia



o condensadas en una sola zona aparentando una mancha oscura (Gonella, et al. 2013).

- **Calidad 3:** cumulus presente, pero expandido. Citoplasma contraído con espacio entre la membrana celular y la zona pelúcida, degenerado, vacuolizado o fragmentado (Gonella, et al. 2013).
- **Calidad 4:** ovocito desnudo sin células del cumulus (Gonella, et al. 2013).

Hawk & Wall (1994), clasificaron a los ovocitos en tres categorías (clasificación empleada para esta investigación) así:

- **Ovocitos de buena calidad (A).**- cumulus compacto, con gran cantidad de capas de células de cumulus. Granulosa adherida al cumulus permisible si el citoplasma se observa claramente. Citoplasma denso y finamente granulado (Hawk and Wall 1994).
- **Ovocitos de calidad intermedia (B).**- cumulus compacto, usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se observa claramente, de pocas a muchas capas de células, cubriendo toda o menos de la mitad de la zona pelúcida. Citoplasma extendido, denso, finamente granulado a gránulos de tamaño moderado (Hawk and Wall 1994).
- **Ovocitos de mala calidad o rechazados (C).**- cumulus parcial o totalmente expandido y disperso, descolorido (oscuro o ligeramente pardo), corona radiada sin cumulus, ovocitos desnudos. Citoplasma con gránulos gruesos, áreas muy claras interrelacionadas con áreas muy oscuras (Hawk and Wall 1994).

(Hazeleger, et al. 1995) propusieron un sistema de clasificación de los ovocitos basados en los aspectos morfológicos, los COC's que mostraron características morfológicas similares fueron agrupadas dando lugar a nueve categorías; a continuación se describe este sistema:



- **Grupo 1.-** Capas de cumulus completas y compactas rodeando un ovocito con un ooplasma homogéneo y consistente, con una coloración medio parda. Ovocitos $>120\mu\text{m}$ de diámetro.
- **Grupo 2.-** Capas del cumulus completas y compactas; el ooplasma es ligeramente más grueso que los del grupo 1, con una zona oscura alrededor de la periferia, de coloración medio parda. Ovocitos $>120\mu\text{m}$ de diámetro.
- **Grupo 3.-** Capas de cumulus completas pero comenzando a expandirse alrededor del borde exterior. El ooplasma muestra aglomeraciones completamente oscuras, coloración medio parda. Ovocitos $>120\mu\text{m}$ de diámetro.
- **Grupo 4.-** cumulus expandido completamente e irregular con aglomeraciones de células degeneradas en una matriz gelatinosa. El ooplasma presenta aglomeraciones completamente oscuras. Ovocitos $>120\mu\text{m}$ de diámetro.
- **Grupo 5.-** Idéntico al grupo 1, pero ambos cumulus y ooplasma son de coloración pálida. Ovocitos $>120\mu\text{m}$ de diámetro.
- **Grupo 6.-** células de la corona radiada son expuestas, las características del citoplasma son variables; Ovocitos $>120\mu\text{m}$ de diámetro.
- **Grupo 7.-** capas del cumulus compactas y completas. El ooplasma es uniformemente de coloración negra. Ovocitos $>120\mu\text{m}$ de diámetro.
- **Grupo 8.-** zona pelúcida expuesta; características variables del citoplasma. Ovocitos $>120\mu\text{m}$ de diámetro.
- **Grupo 9.-** similar al grupo 1, pero con ovocitos $<110\mu\text{m}$ de diámetro.

2.6.2. Diámetro del ovocito.

En estudios realizados se pudo establecer que la habilidad de los ovocitos bovinos en recobrar y completar la meiosis in vitro están relacionados con el diámetro de los mismos; los ovocitos inferiores a $110\mu\text{m}$ son pausados transcripcionalmente y tienen una reducida habilidad para reiniciar la meiosis (Fair, Hyttel and Greve 1995). Los pequeños ovocitos tienden a seguir un patrón anormal de maduración meiótica dando como resultado disturbios en los procesos de maduración (Lechniak, et al. 2002). De



acuerdo a (Otoi, et al. 1997), los ovocitos adquieren ampliamente la competencia para el desarrollo a un diámetro de 120 μm .

2.6.3. Viabilidad de los ovocitos.

La viabilidad de los ovocitos se puede establecer empleando la tinción supravital de azul tripán. Esta tinción se ha empleado en células de diferentes especies y en células germinales fetales, folículos preantrales, ovocitos de hámster y de búfalos (Larocca and Filipiak 2012) (Strober 2015).

La viabilidad celular, empleando esta técnica, esta siendo determinada por la integridad de la membrada celular por lo que es posible que la viabilidad pueda estar comprometida por alteraciones en otras estructuras celulares (Strober 2015). La permeabilidad de las membranas celulares determina la viabilidad de los ovocitos. En un COC muerto o deteriorado, el azul tripán ingresa al citoplasma tiñéndolo de color azul, en aquellos COC que no presentan esta coloración se considera que están íntegros y por lo tanto vivos (Altman, Randers and Rao 1993). La tinción de azul tripán se prepara al 0,15% en FBS (suero fetal bovino) o en un medio similar al que se encuentran los COC's. Los COC's se agregan a gotas de la preparación de azul tripán durante 10 minutos y posteriormente son trasladados nuevamente a medio PBS sin azul tripán donde son lavados. Posteriormente son observados al microscopio óptico de fondo claro o en lupa estereoscópica (Larocca and Filipiak 2012).

2.6.4. Actividad Mitocondrial

Las mitocondrias pueden generar ATP en grandes cantidades, regulan la homeostasis del calcio y la apoptosis. La distribución uniforme de las mitocondrias es importante para el cumplimiento de funciones celulares específicas. Las mitocondrias activas sirven como indicador en procesos de maduración, fecundación y desarrollo embrionario. Uno de los métodos ampliamente empleados para determinar la actividad mitocondrial es la realización del test del azul brillante de cresilo (BCB); esta es una técnica que permite seleccionar los ovocitos que han finalizado su crecimiento y que en teoría son más competentes para llegar al estadio de blastocisto. El BCB



determina la actividad intracelular de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) (Opiela and Kańska-Książkiewicz 2013). Esta enzima se sintetiza dentro del ovocito durante la fase de crecimiento y disminuye cuando se completa esta etapa. La G6PDH al encontrarse activa en el ovocito en crecimiento reduce el colorante BCB a una tonalidad más clara, una vez que el ovocito haya completado su desarrollo no podrá reducir el colorante quedando los ovocitos de color azul (Catalá, et al. 2009).



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales.

3.1.1. Físicos.

Pipetas Pasteur, microscopio, estereoscopio, placas Petri cuadradas, estufa, baño maría, tubos falcon de recolección, equipo para OPU, ecógrafo (Aloka Prosound 2 ®), transductor convexo de 5 MHz, jeringas, agujas, bomba de vacío (WTA BV 003D ®), termo de transporte, vasos de precipitación, tijeras, filtro EMCON, cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD), software (AmScope V.3.7), estufa de Co2 hermetica.

3.1.2. Bioquímicos.

Azul tripán, Azul de crisol brillante, suero fetal bovino (FBS), solución fisiológica (NaCl 0,9%), agua destilada, alcohol, medio Holding, Heparina, Xilacina, lidocaína,

3.1.3. Biológicos.

200 ovarios de matadero, 10 hembras bovinas criollas jóvenes, ovocitos.

3.2. Métodos.

3.2.1. Ubicación de la investigación.

El estudio se llevó a cabo en la granja experimental “Irquis”, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador. (3044181S; 79040813°W); situada a 2.714 msnm, con temperatura promedio de 14°C, humedad relativa 80% y pluviosidad variando entre 800mm y 2.000mm.

3.2.2. Descripción de las unidades de análisis.



Las unidades de análisis estuvieron compuestas por ovocitos recuperados de vaconas criollas por la técnica OPU, y por ovocitos de ovarios de matadero recuperados por aspiración folicular.

Los criterios de inclusión para las vaconas fueron: hembras sexualmente maduras, de 3 a 3,5 de condición corporal (CC), alimentadas todas con el mismo pasto (pastoreo 90% y 10% de premezcla mineral), con ciclicidad normal, y ovarios activos.

Los criterios de inclusión para los ovarios de matadero fueron: ovarios colectados dentro de las dos primeras horas posmortem, con presencia de actividad folicular, ≥ 3 cm de largo, sin presencia de quistes foliculares.

3.2.3. Obtención de ovocitos.

3.2.3.1. Obtención de ovocitos en ovarios de matadero.

Se recolectaron 200 ovarios del Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP), 20 ovarios por cada sesión se realizó un total de 10 sesiones. Los ovarios fueron transportados en Solución Salina a 37,5 °C en termo hermético hasta el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal ubicado en el sector Irquis en un tiempo no mayor a tres horas. En el laboratorio con una tijera se les retiró los tejidos adyacentes con cuidado de no romper ningún folículo y luego fueron lavados dos veces en solución salina estéril.

Para la obtención de los ovocitos se tomaron los ovarios con una toalla de papel y se procedió a puncionar los folículos antrales que tuvieron un diámetro entre 3 y 6 mm. La punción se realizó con una aguja de calibre 1,2 x 75 mm de longitud conectada a una bomba de vacío (WTA BV 003D ®) con una presión de 90mmHg. El producto se recolectó en un tubo Falcon de 50 mL con solución de PBS atemperada en un tiempo no mayor de dos horas.



3.2.4. Obtención de ovocitos en vaconas criollas vivas

Previo a la punción, los animales fueron tranquilizados con Xilacina al 2% (0.02 mg/kpv), se procedió a realizar el vaciado rectal, posteriormente se aplicó un anestésico epidural (lidocaína clorhidrato al 2%), y se continuó con el aseo de la región vulvar.

La obtención de los ovocitos en vaconas vivas se lo realizó por medio de la técnica OPU. Previo a esta práctica se realizaron 4 sesiones de adiestramiento en dos semanas para adaptación de la técnica y de los animales. Para obtener los ovocitos de vaconas vivas se puncionó 10 vaconas criollas dos veces por semana durante 5 semanas con un total de 10 sesiones de Ovum Pick Up (OPU). Los ovocitos fueron recolectados en un medio compuesto por PBS suplementado con 30UI de heparina por cada ml de PBS en un tubo falcon. El equipo para OPU estuvo compuesto por un ecógrafo (Aloka Prosound 2 ®) provisto de un transductor convexo de 5Mhz montado en una guía con una aguja de 1,2 (18G) x 75 mm de longitud conectado a una bomba de vacío calibrada a 90mmHg.

3.2.5. Manejo de los Ovocitos.

Una vez obtenido los ovocitos por aspiración folicular en ovarios de matadero, y por la técnica OPU en animales vivos, los mismos que estuvieron suspendidos en la solución formada por PBS y heparina, por separado, se tomó el precipitado de cada tubo Falcon con una pipeta Pasteur y se transportaron a una caja Petri cuadrada de 95mm, se observó con una lupa estereoscópica para realizar la búsqueda de los complejos Cúmulo Ovocitos (COC's) una vez encontrados estos fueron aislados en una caja Petri de 35 mm que contienen medio Holding.

Los ovocitos encontrados se clasificaron y verificaron su calidad y viabilidad mediante el análisis de tamaño ovocitario, tinción supravital de azul tripan y, análisis de actividad mitocondrial con el uso de la tinción supravital de azul brillante de cresilo (BCB).



3.2.5.1. Clasificación de los ovocitos.

Los ovocitos se clasificaron de acuerdo a la escala propuesta por (Hawk and Wall 1994) así:

- **Calidad Buena (A).**- Cumulo compacto, con varias capas de células. Granulosa adherida es permisible si el citoplasma se ve claramente; el ovocito es homogéneo, denso y finamente granulado.
- **Calidad Intermedia (B).**- Cumulus grueso y compacto, usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; con pocas o varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida; el ovocito va desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado.
- **Rechazado.**- cúmulos parcial o completamente expandido con cumulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cumulo descolorido (café claro o muy oscuro), corona radiada sin cúmulo y ovocitos denudos. El ovocito es de granulación gruesa o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido, ovocitos deformes.

3.2.5.2. Medición de los ovocitos

La medición del diámetro del ovocito se realizó con la ayuda de una cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD) montada sobre un microscopio invertido con lente 10X y provista del software (AmScope V.3.7).

3.2.5.3. Viabilidad ovocitaria (Permeabilidad de membrana).

La viabilidad de los ovocitos se determinó a través de la permeabilidad de las membranas celulares con el uso de la tinción supravital de azul de tripano. La solución para la tinción fue preparada al 0,15% en PBS. Los COC's se agregaron a gotas de la solución tinción de azul tripan durante 10 minutos y posteriormente fueron trasladados nuevamente a medio PBS sin azul tripan donde se lavaron y posteriormente



observados en microscopio óptico de fondo claro.

3.2.5.4. Actividad mitocondrial.

Los ovocitos clasificados por su calidad, tamaño y viabilidad fueron sometidos a la prueba de tinción azul brillante de cresilo (BCB), colorea el citoplasma de los ovocitos si la enzima Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) ya no está activa. Los ovocitos que presentan actividad de esta enzima se mantienen incoloros. La solución tinción se prepara a 26 μ M de BCB en PBS. En gotas de esta solución se ubicaron ovocitos clasificados, medidos y viables, se cultivaron en una atmosfera a 38,5°C, 5% de CO₂ y Humedad relativa de 90% durante 90 minutos. Pasado este tiempo se evaluó bajo un estereoscopio.

3.2.6. Diseño experimental y análisis estadístico.

Se planteó un diseño completo al azar; los datos obtenidos fueron analizados en el programa estadístico SPSS versión 22.0. Se realizó la prueba de *Chi-cuadrado* para comparar medias entre las dos fuentes de ovocito que fueron consideradas como variables No paramétricas tipo ordinales, se aplicó el estadístico “U de Mann Withney” (P<0,05) para comprobar diferencias significativas.

3.2.7. Recolección de datos.

Se cuantificó y calificó los ovocitos de los dos orígenes y fueron separados según su clasificación (A, B y C), tamaño, vitalidad y actividad mitocondrial, los resultados fueron expresados numéricamente y transformados en porcentajes por cada grupo.

3.2.8. Tratamientos.

Como tratamientos fueron considerados los dos métodos de obtención o recuperación de ovocitos:

- Método 1. OPU (Ovum Pick Up)



- Método 2. Punción folicular en ovarios de matadero

3.2.9. Variables de la investigación.

3.2.9.1. Variables independientes

- Método de obtención de ovocitos.
 - Método 1. OPU (Ovum Pick Up)
 - Método 2. Punción folicular en ovarios de matadero

3.2.9.2. Variables dependientes

- Calidad de ovocitos.- Los ovocitos obtenidos por las dos vías (ovarios de matadero y de vaconas vivas) fueron evaluados y clasificados según los criterios de (Hawk and Wall 1994) en las categorías A, B, y C
- Tamaño de los ovocitos.- Los ovocitos agrupados según su origen (matadero o vaconas vivas), fueron sometidos a la medición de su diámetro. El resultado se expresó en micras y fue clasificado en categorías arbitrariamente: grandes ($>150\mu\text{m}$), medianos (entre $120\mu\text{m}$ y $150\mu\text{m}$) y pequeños ($< 120\mu\text{m}$).
- Viabilidad ovocitaria (Permeabilidad de membrana).- La viabilidad de los ovocitos fue evaluada a través de la permeabilidad de las membranas celulares mediante el uso del colorante azul de tripan según la técnica sugerida. Los resultados se presentaron en forma numérica tanto para ovocitos viables (ovocitos incoloros) como para ovocitos muertos (ovocitos azules) y llevados a porcentajes.
- Actividad mitocondrial.- Los ovocitos clasificados por su calidad, tamaño y vitalidad fueron sometidos a la prueba de azul brillante de cresilo (BCB) para determinar el grado de crecimiento ovocitario. Los ovocitos que se colorean de



azul se consideraron como maduros o totalmente desarrollados, mientras que los que no se colorearon de azul o tuvieron una coloración levemente azulada fueron considerados como ovocitos inmaduros o en crecimiento. Los resultados se representaron numéricamente y llevados a porcentaje tanto para los ovocitos positivos a BCB como los negativos a esta tinción.



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1. Calidad Ovocitaria.

En la tabla 1 se expresa los resultados obtenidos de la clasificación de los ovocitos bajo los parámetros dados por (Hawk and Wall 1994).

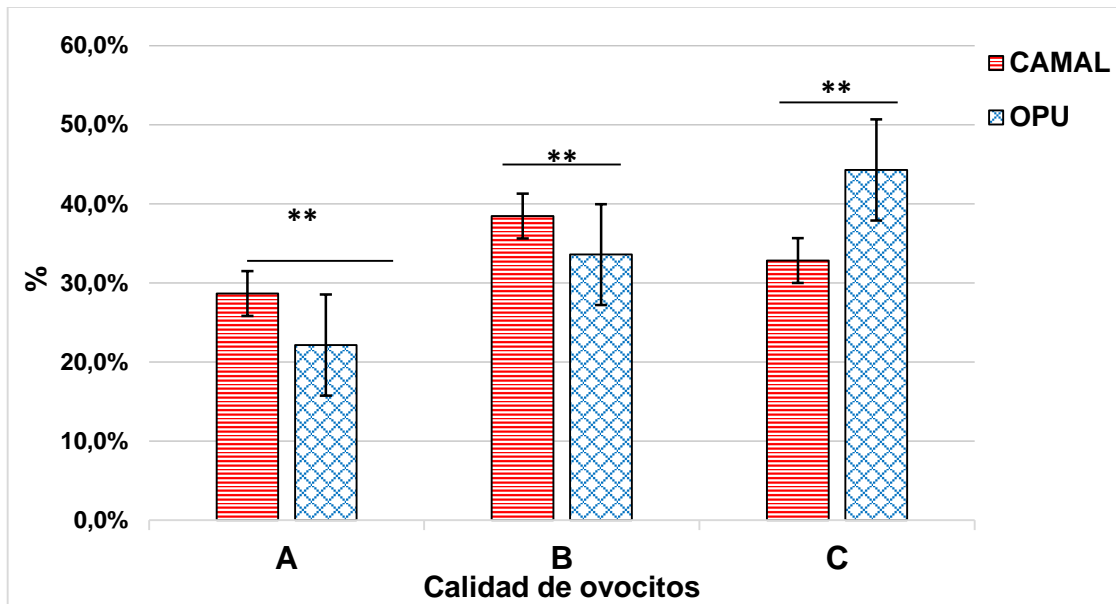
Tabla 1. Frecuencia y porcentaje de ovocitos de acuerdo a su calidad en las dos fuentes

Fuente de ovocitos		Calidad de ovocitos			Total
		A	B	C	
Camal	Recuento	214.0	287.0	245.0	746.0
	%	28.7 ^a	38.5 ^a	32.8 ^b	100.0
OPU	Recuento	58.0	88.0	116.0	262.0
	%	22.1 ^b	33.6 ^b	44.3 ^a	100.0
TOTAL	Recuento	272.0	375.0	361.0	1008.0
	%	27.0	37.2	35.8	100.0

Letras diferentes en cada columna ^(a,b) indican diferencias significativas, según Chi-cuadrado ($P < 0.05$)

Los resultados y análisis realizados indican diferencias estadísticas entre las dos fuentes de recuperación ovocitaria, favoreciendo a los ovocitos obtenidos de ovarios de matadero en las tres categorías de ovocitos. Porcentualmente se obtuvo mayor cantidad de ovocitos de calidad B (37,2%) seguido de los ovocitos de mala calidad o C (35,8%) y finalmente los ovocitos de buena calidad o A (27,0%).

Figura N° 1. Distribución porcentual de ovocitos de acuerdo a su calidad y su fuente.



En la figura se observa claramente que los ovocitos de calidades aceptables (A y B) se obtuvieron mayoritariamente de los ovarios de matadero comparado con los ovocitos obtenidos de las hembras criollas por medio de la técnica OPU, generando diferencias significativas,



4.2. Tamaño y categorización de los ovocitos

4.2.1. Tamaño de los ovocitos.

Las dimensiones obtenidas del ovocito en lo que respecta a diámetro, área, perímetro y radio se pueden apreciar en la tabla 2.

Tabla 2. Valor promedio y error estándar de la media de parámetros de dimensión de ovocitos medidos en las dos fuentes

Parámetros de medición de ovocitos	N	X ± SEM	intervalo de confianza al 95%		
			Límite inferior	Límite superior	
Diámetro (µm)	Camal	746	127.2 ± 0.59 ^a	126.0	128.4
	OPU	262	122.9 ± 0.48 ^b	122.0	123.9
Área (µm ²)	Camal	746	12910.6 ± 141.73 ^a	12632.4	13188.9
	OPU	262	11919.0 ± 92.20 ^b	11737.4	12100.5
Perímetro (µm)	Camal	746	399.6 ± 1.86 ^a	395.9	403.2
	OPU	262	386.3 ± 1.50 ^b	383.3	389.2
Radio (µm)	Camal	746	63.6 ± 0.30 ^a	63.0	64.2
	OPU	262	61.5 ± 0.24 ^b	61.0	61.9

Letras diferentes en cada columna ^(a,b) indican diferencias significativas, según ANOVA (P < 0.05)

Los ovocitos de mayor tamaño se obtienen, de los ovarios de matadero, las vaconas criollas incluidas en la investigación generaron ovocitos con diámetro de 122,9 ±0,48 micras, por debajo del diámetro de los ovocitos de ovarios de matadero (127,2 ±0,59).



4.2.2. Categorización de los ovocitos.

Los resultados de la categorización de los ovocitos se observa en la tabla 3.

Tabla 3 Categorización de los ovocitos.

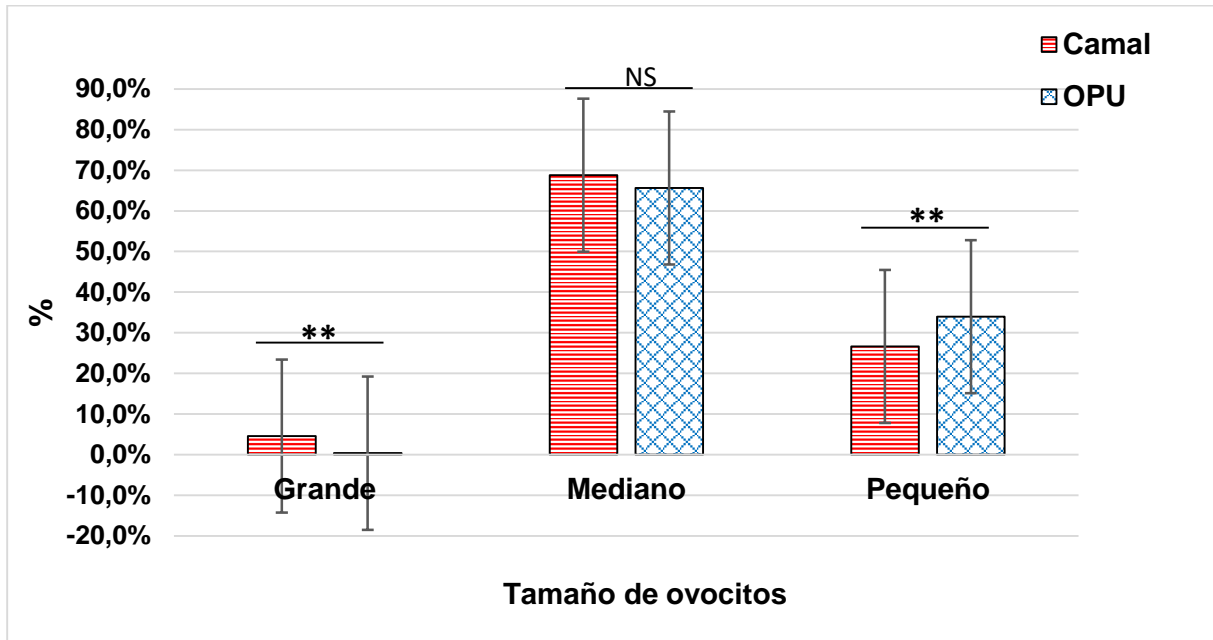
Fuente de ovocitos		Tamaño*			Total
		Grande	Mediano	Pequeño	
Camal	Recuento	34	513	199	746
	%	4.6 ^a	68.8 ^a	26.7 ^b	100.0
OPU	Recuento	1	172	89	262
	%	0,4 ^b	65.6 ^a	34.0 ^a	100.0
Total	Recuento	35	685	288	1008
	%	3.5	68.0	28.6	100.0

^(a,b) Letras diferentes en cada columna y en cada tamaño indican diferencias significativas, según Chi-cuadrado ($P < 0.05$)

*Ovocitos: Grande.- $>150\mu\text{m}$; Mediano.- de 120 a $150\mu\text{m}$; Pequeño.- $<120\mu\text{m}$

Los resultados en cuanto a la categorización por tamaño de los ovocitos obtenidos, señalan que entre las fuentes los ovocitos categorizados como “Grandes”, y “pequeños” se comportan de diferente manera, favoreciendo en cuanto a los ovocitos de categoría grande a los obtenidos de material de matadero, mientras que en los ovocitos pequeños, hay mayor expresión en los obtenidos por la técnica OPU. Los ovocitos medianos se comportan de similar manera.

Figura N° 2 Distribución de los ovocitos categorizados según la fuente (OPU o camal).



En la figura se observa que los ovocitos de tamaño mediano (entre 120 y 150 μ m) fueron los que mayor proporción porcentual demostraron, sin embargo entre las dos fuentes de ovocitos no se observan diferencias significativas.



4.3. Viabilidad de ovocitos

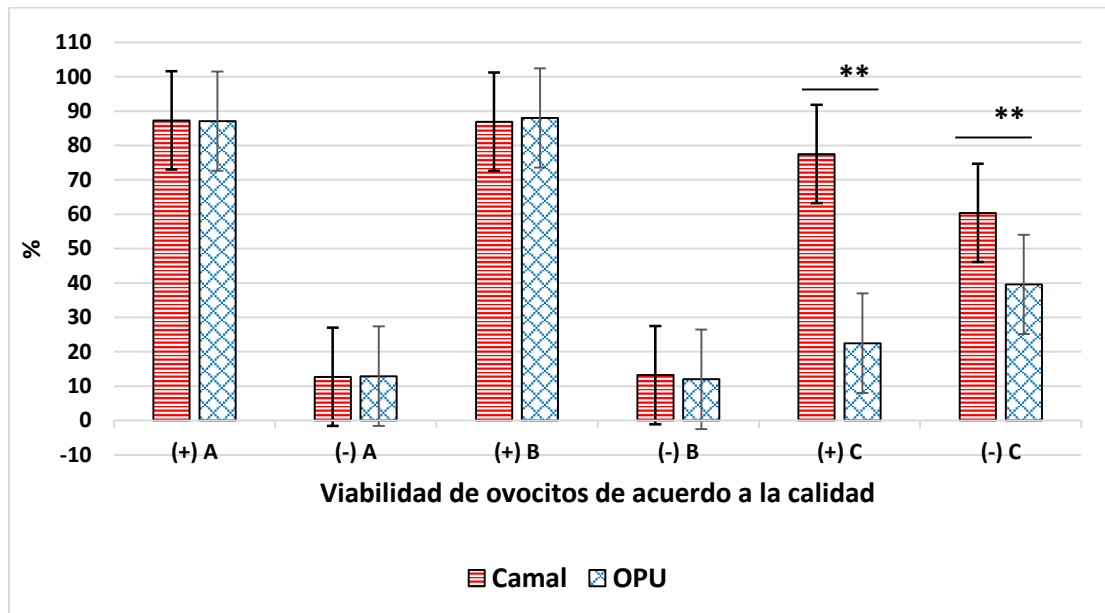
Tabla 4. Frecuencia y porcentaje de la viabilidad de ovocitos (+/ -) de acuerdo a su fuente y calidad.

Viabilidad		Fuente de ovocitos								
		A			B			C		
		Camal	OPU	Total	Camal	OPU	Total	Camal	OPU	Total
Viable	Recuento	124	27	151	132	44	176	107	32	139
	%	87.3 ^a	87.1 ^a	87.3	86.8 ^a	88.0 ^a	87.1	77.5 ^a	60.4 ^b	72.8
No viable	Recuento	18	4	22	20	6	26	31	21	52
	%	12.7 ^a	12.9 ^a	12.7	13.2 ^a	12.0 ^a	12.9	22.5 ^a	39.6 ^b	27.2
Total	Recuento	142	31	173	152	50	202	138	53	191

Letras diferentes en cada fila^(a,b) y en cada calidad de ovocito, muestra diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Chi-cuadrado ($P < 0.05$)

Observando los resultados de la tabla 4, encontramos que en los ovocitos de calidades A y B, las fuentes generan igual porcentaje de viabilidad; sin embargo, al observar los ovocitos de calidad C, encontramos que la recuperación ovocitaria en las vacas criollas generó un mayor porcentaje de ovocitos no viables.

Figura N° 3. Porcentaje de la viabilidad de ovocitos de acuerdo a su fuente y calidad



En la figura anterior se observa que no existen diferencias estadísticas entre los ovocitos viables obtenidos de los ovarios de matadero y de las vacas criollas; además, tampoco existen diferencias estadísticas entre los ovocitos de calidad A y B. Aunque los ovocitos de calidad C no son empleados para un proceso de maduración in vitro para la producción de embriones en laboratorio, se puede apreciar diferencias significativas $P (\leq 0.05)$ en cuanto a la cantidad ovocitos viables.



4.4. Actividad mitocondrial

Tabla 5. Frecuencia y porcentaje de ovocitos que reaccionaron a la tinción con BCB de acuerdo a su fuente y calidad

Fuente de ovocitos		Calidad de ovocitos								
		A			B			C		
		BCB (+)	BCB (-)	Total	BCB (+)	BCB (-)	Total	BCB (+)	BCB (-)	Total
Camal	Recuento	35	84	119	28	159	187	25	151	176
	%	29.4 ^a	70.6 ^a	100.0%	15.0 ^a	85.0 ^a	100.0%	14.2 ^a	85.8 ^a	100.0%
OPU	Recuento	6	29	35	6	33	39	7	59	66
	%	17.1 ^a	82.9 ^a	100.0%	15.4 ^a	84.6 ^a	100.0%	10.6 ^a	89.4 ^a	100.0%
Total	Recuento	41	113	154	34	192	226	32	210	242
	%	26.6%	73.4%	100.0%	15.0%	85.0%	100.0%	13.2%	86.8%	100.0%

Letras diferentes en cada columna^(a,b) y en cada calidad de ovocito, muestra diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Chi-cuadrado ($P < 0.05$)

BCB+.- respuesta positiva a la tinción con azul brillante de cresilo (ovocitos azules); BCB-.- Respuesta negativa a la tinción con azul brillante de cresilo (ovocitos incoloros)

Los resultados obtenidos indican que los ovocitos obtenidos tanto de ovarios de matadero por aspiración folicular como de animales vivos por la técnica OPU, presentaron similitud en cuanto a respuesta de la actividad mitocondrial a la tinción con azul brillante de cresilo. A pesar de que en los ovocitos de calidad "A" hay una ampliada diferencia entre los ovocitos BCB (-) entre las dos fuentes camal y OPU, estadísticamente no se expresa diferencias significativas. ($p > 0,05$).



CAPITULO V: DISCUSIÓN

La cantidad de ovocitos de clase A y B obtenidos de las hembras bovinas jóvenes de raza autóctona o criolla alcanza el 55,7% del total de los ovocitos recuperados por la técnica OPU. Mientras que la tasa de ovocitos recuperados de ovarios de matadero por medio de aspiración folicular fue de 67,2% entre las dos categorías. En un estudio realizado por (Kouamo, et al. 2014) sobre el potencial del ganado local tipo cebuino en Camerún, obtuvo tasas de recuperación ovocitaria entre 55,12% y 58,00% en ovarios de matadero, menores a los obtenidos en el mismo tipo de fuente en este estudio y que pudo estar afectado por la edad del animal, la condición corporal, el estado de preñez y el tamaño de los ovarios; a pesar de esto, el autor concluyó manifestando que las razas locales cebuinas que se emplearon en el estudio tienen un buen potencial para la producción de embriones in vitro.

En los ovocitos de ganado criollo recuperados mediante la técnica OPU se pudo obtener un 22,1% de ovocitos de calidad A. Aunque, con otra escala de clasificación de calidad de los ovocitos, (Manik , Singla and Palta 2003) obtuvieron con la técnica OPU 32% de ovocitos de calidad A y B en bovinos de raza cebuina autóctona Karan Fries. Los resultados generados tanto por la raza autóctona empleada por (Manik , Singla and Palta 2003) y por la empleada en esta investigación difieren probablemente por el estado reproductivo, tipo y la edad de los animales empleados ya que (Manik , Singla and Palta 2003) trabajó con animales cebuinos, seniles (>10 años) y acíclicos mientras que en este trabajo se emplearon animales jóvenes, taurus y cíclicos; además, en cuanto a los animales jóvenes empleados en esta investigación, estudios señalan que según la cantidad de folículos antrales obtenidos, las concentraciones de progesterona circulante (hormona que favorece el óptimo desarrollo de los ovocitos en el ovario) pudieron estar crónicamente reducidas desde el inicio hasta la mitad de la fase luteal, reduciendo la calidad de los folículos y ovocitos (Evans, et al. 2012).

Por otra parte, los resultados obtenidos concuerdan con los de (Chaubal, et al. 2006), empleando para la OPU agujas descartables 18G y una presión de 90mmHg, animales bos taurus de cruce con Angus, y con los de (Alvarado, et al. 2016) que



empleó vacas de descarte de 9 años, estos investigadores obtuvieron 19% y 25% respectivamente de ovocitos de calidad A y B (escala de 4 categorías). La proporción de las calidades de ovocitos obtenidos de ovarios de matadero empleados en esta investigación a través de la técnica de aspiración folicular difieren con los resultados obtenidos por (González, et al. 1992), estos investigadores emplearon en la investigación ovarios de vacas y novillas de cruce entre razas cebuinas y europeas (Cebu x razas lecheras). Las diferencias encontradas entre los reportes y esta investigación pudiera darse a que las hembras bovinas de raza cebuina tienen la capacidad de producir mayor cantidad de folículos en comparación con las razas europeas (Oliveira, et al. 2010).

El tamaño de los ovocitos promedian $127.2 \pm 0.59 \mu\text{m}$ para los obtenidos en ovarios de matadero, y $122.9 \pm 0.48\mu\text{m}$ para los obtenidos por la técnica OPU. (Fair, Hyttel and Greve 1995) establecieron que un ovocito tiene competencia para el desarrollo y maduración in vitro a partir de $110\mu\text{m}$ que provienen de folículos de 3mm, los ovocitos recuperados en esta investigación superan a esta medición por lo que podrían ser empleados en procesos de maduración in vitro coincidiendo con los resultados obtenidos por (Hazeleger, et al. 1995) y por (Otoi, et al. 1997). Además, la cantidad de ovocitos medianos (entre $120\mu\text{m}$ y $150\mu\text{m}$) se presentó en mayor proporción (68%) permitiendo que estos ovocitos puedan ser integrados en un programa de producción in vitro de embriones o ser congelados para conformar un banco de germoplasma de la raza criolla.

Los ovocitos viables obtenidos no difieren estadísticamente entre las dos fuentes ni entre las categorías A y B, obteniéndose una tasa de viabilidad 87,3% y 87,1% respectivamente. Estos resultados son superiores a los obtenidos por (Calvo, et al. 2004) quienes emplearon otro método de evaluación de la viabilidad ovocitaria (MTT) obteniendo 76,9% de ovocitos viables. En cuanto a la actividad mitocondrial, los ovocitos con actividad enzimática (G6PDH) fueron determinados por el test BCB. En los datos obtenidos se observó que las hembras bovinas criollas produce mayores tasas de ovocitos de clase A capacitados para el desarrollo in vitro (82,9%) que los obtenidos en los ovocitos de matadero (70,6%), diferencia que pudiera deberse al



estado de los ovarios al momento de la colecta y el tiempo transcurrido hasta la aspiración folicular. Resultados obtenidos por (Mota 2008) al recuperar ovocitos por aspiración folicular en ovarios de matadero alcanzaron el 60,37% BCB (-) de respuesta a la prueba resultando diferentes a los presentados aquí. Los resultados dados se apegarían también, a más del estado de los ovarios y el tiempo trascendido para la recuperación ovocitaria a factores físicos, (Mota 2008) que utilizó para la aspiración agujas de calibre 21G, en este trabajo se empleó agujas de calibre 18G. (Otero 2008) obtuvo 46% de BCB(-) obtenidos por la misma técnica.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La calidad y morfometría de los ovocitos obtenidos de las dos fuentes: ovarios de matadero y vaconas criollas por las técnicas de aspiración folicular y OPU respectivamente son diferentes, favoreciendo a los ovocitos de calidad A y B sobre los de calidad C; existiendo también diferencias entre las fuentes. La viabilidad y actividad enzimática se comportan de igual manera en las dos fuentes.

Aunque la calidad ovocitaria fue superior en los ovocitos obtenidos de ovarios de matadero, la técnica de recuperación ovocitaria guiada por ultrasonografía OPU es repetible, y además, permite conocer el origen de los ovocitos, lo que no se puede hacer con los ovarios de matadero.

Los ovocitos recuperados de ovarios de matadero por la técnica de aspiración folicular y en vaconas criollas por la técnica OPU, no mantienen la misma calidad pero si la viabilidad y actividad enzimática debido a que al observar los ovocitos de calidad C, encontramos que la recuperación ovocitaria en las vacas criollas generó un mayor porcentaje de ovocitos no viables.

En vista de lo descrito anteriormente recomendamos que los ovocitos obtenidos mediante la técnica de OPU se puedan usar para formar bancos de germoplasma de ganado autóctono o criollo por sus características de rusticidad, resistencia y adaptabilidad ampliando así el potencial reproductivo de este tipo de ganado para conservar el patrimonio zoo genético del país.

En cuanto a los ovarios de camal se deben tomar de vacas de biotipo criollo que van a ser faenadas que ampliarían las oportunidades para construir bancos de germoplasma que permitan la conservación de este biotipo ya que como lo expresamos en esta investigación es posible obtener ovocitos de buena calidad y viabilidad.



CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adams, G. P., R. Jaiswal, J. Singh, and P. Malhi. "Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle." Science direct; Theriogenology 69; pag 72–80. 2008.
https://www.researchgate.net/profile/Jaswant_Singh10/publication/5867038_Progress_in_understanding_ovarian_follicular_dynamics_in_cattle/links/00b7d52ebcecd20a43000000.pdf (accessed 09 16, 2016).
2. Altman, Steven A., Lisa Randers, and Govind Rao. "Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations." Biotechnol. Prog.; 9; pp 671-674. 1993. (accessed 11 2, 2016).
3. Alvarado, Armando Enrique, Guiselle Gamarra, Amalia Gallegos, and V. Samillan. "TASA DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS EN VACAS HOLSTEIN EN DESCARTE." Universidad Nacional Agraria La Molina; Anales Científicos, 77; pag 63-68. 2016. (accessed 09 28, 2016).
4. Araujo, Valdevane, Melba Gastal, José Figueiredo, and Eduardo Gastal. "In vitro culture of bovine preantral follicles: a review." Biomed central; Reproductive Biology and Endocrinology; 14 pag. 2014.
[http://download.springer.com/static/pdf/975/art%253A10.1186%252F1477-7827-12-78.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Frbej.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2F1477-7827-12-78&token2=exp=1476467664~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F975%2Fart%25253A10.1186%25252F1477-7827-12-](http://download.springer.com/static/pdf/975/art%253A10.1186%252F1477-7827-12-78.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Frbej.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2F1477-7827-12-78&token2=exp=1476467664~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F975%2Fart%25253A10.1186%25252F1477-7827-12-78) (accessed 30 1, 2016).
5. Arav, A. "TRANSILLUMINATION INCREASES OOCYTE RECOVERY FROM OVARIES COLLECTED AT SLAUGHTER. A NEW TECHNIQUE REPORT." Elsevier Science Inc.; Theriogenology 55; pag 1561-1565. 2001. (accessed 09 25, 2016).
6. Benavides, Lenin, Wilfredo Huanca, and Lisbeth Quintanilla. "Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el Desarrollo de Ovocitos Bovinos Fecundados y Cultivados in vitro." Revista de investigacion veterinario Perú; vol 26; pp 596-603. 2015.
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11215> (accessed Marzo 30, 2016).
7. Bilodeau, Sylvie, and Paul Panich. "Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos." Animal Reproduction Science 71; pag 143–155. 2002. (accessed 10 12, 2016).



8. Boni, R. "Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis." *Animal Reproduction*, V.9; pag 362-369. 2012. (accessed 09 14, 2016).
9. Calvo, J., V. Pérez, D. Fila, and E. Campos. "Evaluación de la viabilidad de ovocitos bovinos mediante la utilización de 3-(4-5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide." *Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*; vol 39; pp 7-10. 2004. (accessed 11 3, 2016).
10. Catalá, María, Roser Morato, Roser Romaguera, Dolores Izquierdo , and M. Teresa Paramio. "ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE OVOCITOS DE CORDERA SELECCIONADOS MEDIANTE EL TEST DEL BCB (AZUL DE CRESOL BRILLANTE)." *AIDA, XIII Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II*, pag 684-686. 2009. (accessed 10 12, 2016).
11. Chasombat, Jakkhaphan, Denpong Sakhong, Takashi Nagai, Rangsun Parnpai, and Thevin Vongpralub. "Superstimulation of Follicular Growth in Thai Native Heifers by a Single Administration of Follicle Stimulating Hormone Dissolved in Polyvinylpyrrolidone." *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 59, No 2, pp 214–218. 2013. (accessed 11 4, 2016).
12. Chaubal, S. A., et al. "Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows." *Science direct; Theriogenology* 65; pag 1631–1648. 2006. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05003997> (accessed 09 15, 2016).
13. Corredor, Emma, and Edwin Páez. "Aplicaciones de la ultrasonografía en la reproducción bovina: revisión." *Ciencia y Agricultura Vol. 9 - Nº. 2*; pag 29-37. 2012. http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencia_agricultura/article/view/2813/2581 (accessed 10 01, 2016).
14. Crocomo, L. F., W. C. MARques, F. C. Landim, and S. D. Bicudo. "Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos." *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.36, n.1, pag 25-31. 2012. <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v36n1/pag25-31.pdf> (accessed 09 30, 2016).
15. De Rensis, Fabio, and Rex John Scaramuzzi. "Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow -a review." *Elsevier Science Direct; Theriogenology*, vol 60; pp 1139-1151. 2003. (accessed 10 31, 2016).
16. Ding, Li-Jun, et al. "Different Intervals of Ovum Pick-Up Affect the Competence of Oocytes to Support the Preimplantation Development of Cloned Bovine Embryos." *Mol. Reprod. Dev.* 75: pag 1710–1715. 2008.



<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20922/abstract> (accessed 09 16, 2016).

17. El-Raey, Mohamend, and Takashi Nagai. "Different Aspects of Cattle Oocyte in vitro Maturation: Review." *Journal of Reproduction and Infertility* 5 (1); pag 01-13. 2014. (accessed 10 02, 2016).
18. Eppig, Jhon J. "Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals." *Society for Reproduction and Fertility*; N 122; pag 829–838. 2001. (accessed 09 28, 2016).
19. Evans, A., et al. "Effects of Maternal Environment During Gestation on Ovarian Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring." *Reproduction Domestic Animals*; Vol 47; pp 31–37. 2012. (accessed 10 31, 2016).
20. Fair, T., P. Hyttel, and T. Greve. "Bovine Oocyte Diameter in Relation to Maturational Competence and Transcriptional Activity." *WILEY-LISS, INC.; MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT* 42: pag437-442. 1995. (accessed 10 12, 2016).
21. Ferré, Luis, and Luciano Cattaneo. "Biotecnologías reproductivas: producción in vitro de embriones y semen sexado.(¿La pareja perfecta?)." *Rev.Med. Vet. (B. Aires)*; 94, pag 28-36. 2013. (accessed 12 2016, 6).
22. Filipiak, Y., M. Viqueira, and A. Bielli. "Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos." *SMVU-Veterinaria (Montevideo) Volumen 52; N° 202; pag 14-22. 2016.*
<http://www.scielo.edu.uy/pdf/vet/v52n202/v52n202a02.pdf> (accessed 09 18, 2016).
23. Galli, C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi, and G. Lazzari. "EMBRYO PRODUCTION BY OVUM PICK UP FROM LIVE DONORS." *Elsivier; Theriogenology* 55; Pag1341-1357. 2001.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01004861> (accessed 09 28, 2016).
24. Garcés, Jorge, María P. Vélez, Neil Vásquez, Bernardo Agudelo, and Juan Maldonado. "Aplicaciones biotecnológicas del desarrollo in vitro de folículos bovinos obtenidos de ovarios fetales o prepúberes. Revisión de Literatura." *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; Vol 12; pp 138-144. 1999. (accessed 10 31, 2016).
25. Gonella, Angela, Jorge Atuesta, Sandra Bernal , and Liliana Chacón. "Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro." *Revista de*



- Investigación Agraria y Ambiental; Volumen 4 Número; pag 65-80 . 2013.
http://www.produccionbovina.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/39-generalidades_de_la_produccion.pdf (accessed 09 30, 2016).
26. González, Romualdo, Eleazar Soto, Nelson Delgado, Germán Portillo, Aitor De Ondiz, and Juan Carlos Velarde. "Comparación de dos métodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados." *Revista Científica; FCV de LUZ; Vol II; pag 11-13.* 1992. (accessed 10 28, 2016).
27. Gordon, Ian. *Laboratory production of cattle embryos.* 2da edición. Dublin: CABI Publishing, 2003.
28. Hansen, P. J., et al. "Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation." Elsevier Science Inc; *Theriogenology* 55; pp 91-103. 2001. (accessed 10 28, 2016).
29. Hawk, H. W., and R. J. Wall. "IMPROVED YIELDS OF BOVINE BLASTOCYSTS FROM IN VITRO-PRODUCED OOCYTES. I. SELECTION OF OOCYTES AND ZYGOTES." Elsevier; *Theriogenology* 41: pag: 1571-1583. 1994.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9490822Z>
(accessed 10 10, 2016).
30. Hazeleger, N. L., D. J. Hill, R. B. Stubbings, and J. S. Walton. "Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro." *Theriogenology*; vol 43; pp 509-522. 1995. (accessed 11 4, 2016).
31. Herradón, P. G., L. A. Quintela, J.J. Becerra, S. Ruibal, and M. Fernandez. "Fecundación in vitro: alternativa para la mejora genética en bovinos." *Archivos latinoamericanos de producción animal*; vol 15;. 2007. (accessed 10 30, 2016).
32. Ireland, J. J., et al. "Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve." CSIRO PUBLISHING; *Reproduction, Fertility and Development*, 23, pag 1–14. 2011. (accessed 10 2, 2016).
33. Ireland, J. L.H., et al. "Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle." *Biology of reproduction*; vol 79, pp 1219-1225. 2008. (accessed 10 28, 2016).



34. Karadjole, Martina, et al. "The developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up." *VETERINARSKI ARHIV* 80; pag 445-454,. 2010. <http://www-staro.vef.unizg.hr/vetarhiv/papers/2010-80-4-1.pdf> (accessed 09 15, 2016).
35. Kouamo, J., S. M. Dawaye, A. P. Zoli, and G. S. Bah. "Evaluación of bovine (*Bos indicus*) ovarian potential for in vitro embryo production in the Adamawa plateau (Cameroon)." *Veterinary Journal*, Vol 4(2); pag 128-136. 2014. (accessed 10 23, 2016).
36. Larocca, C., and Y. Filipiak. *UTILIZACIÓN DEL AZUL TRIPÁN PARA DIFERENCIAR OVOCITOS BOVINOS VIVOS Y MUERTOS EN FERTILIZACIÓN IN VITRO*. *Arch. Zootec.* 61 (234): pag 309-312. 2012. (accessed 10 15, 2016).
37. Lechniak, Dorota, Dorota Kaczmarek, Daniel Stanislawsky, and Tatiana Adamowicz. "The ploidy of in vitro mature bovine oocytes is related to the diameter." *Theriogenology*; v 57; pag 1303-1308. 2002. (accessed 10 25, 2016).
38. Leibfried, L., and N. L. Firts. "CHARACTERIZATION OF BOVINE FOLLICULAR OOCYTES AND THEIR ABILITY TO MATURE IN VITRO." *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, Vol. 48, No. 1; pag 76-86. 1979. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/48/1/JAN0480010076> (accessed 10 14, 2016).
39. Lliteras, Emilia, and M. Chong. "Avances en la criopreservacion de ovocitos." *Ciencia y tecnología ganadera*; Vol. 3 No. 1, p. 1-13,. 2009. [http://www.actaf.co.cu/revistas/Revista%20CIMAGT/Rev.Vol.3%20No.1%20009/Vol.3\(1\)09Emilia.pdf](http://www.actaf.co.cu/revistas/Revista%20CIMAGT/Rev.Vol.3%20No.1%20009/Vol.3(1)09Emilia.pdf) (accessed 09 17, 2016).
40. Lonergan, P., P. Monaghan, D. Rizos, M. P. Boland, and I. Gordon. "Effect of Follicle Size on Bovine Oocyte Quality and Developmental Competence Following Maturation, Fertilization, and Culture In Vitro." *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT*; 37 pag 48-53. 1994. (accessed 12 06, 2016).
41. Machatková, M., E. Jokesová, J. Petelíková, and V. Dvoráček. "Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle." *Theriogenology*; Vol 45; Issue 4; pp 801-10. 1996. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9600009X> (accessed 10 29, 2016).



42. Manik , R. S., S. K. Singla, and P. Palta. "Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle." *Animal Reproduction Science* 76; pag 155–161. 2003. https://www.researchgate.net/profile/Suresh_Singla3/publication/10899634_Collection_of_oocytes_through_transvaginal_ultrasound-guided_aspiration_of_follicles_in_an_Indian_breed_of_cattle/links/0deec5208ec9740e94000000.pdf (accessed 09 15, 2016).
43. Mermillod, P., et al. "Factors Affecting Oocyte Quality: Who is Driving the Follicle?" *Reprod Dom Anim* 43 (Suppl. 2), pp 393–400. 2008. (accessed 10 31, 2016).
44. Merton, J. S., et al. "Factors affecting oocyte quality and quantity in coomercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry." Elsevier; *Theriogenology* 59; pag 651-674. 2003. (accessed 10 5, 2016).
45. Mota, Gustavo Bruno. "Desenvolvimento e expressão genica em oócitos bovinos imaturos selecionados por azul cresil brilhante." Universidade Federal de Viçosa; 62 pp. 2008. (accessed 10 28, 2016).
46. Moussa, M., J. Shu, X. H. Zhang, and F. Zeng. "Maternal control of oocyte quality in cattle "a review"." Elsevier; *Animal Reproduction Science*; 17 pp. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.011> (accessed 10 23, 2016).
47. Oikawa, Toshinori, Tomoko Itahashi, and Takashi Numabe. "Improved embryo development in Japanese black cattle by in vitro fertilization using ovum pick-up plus intracytoplasmic sperm injection with dithiothreitol." *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 62, No 1; pag 11-16. 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4768774/pdf/jrd-62-011.pdf> (accessed 10 12, 2016).
48. Oliveira, A. C., F. S. Rosas, R. L. Ereno, and C. M. Barros. "Técnicas de sincronização para superovulação de doadoras *Bos taurus* y *Bos indicus*." *4to Simpósio Internacional de Reprodução animal aplicada*. Faculdade de Medicina Veterinária y Zootecnia; Universidad de São Paulo; 209 pp. 2010. (accessed Octubre 25, 2016).
49. Opiela, Jolanta, and Luciana Kańska-Książkiewicz. "The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP)." *Reproductive Biology*; vol13; pp 177-183. 2013. (accessed 2016).



50. Otero, Rafael. "Classificação de ovocitos imaturos de bovinos pela utilização de azul cresil brilhante." Universidad Federal de Viçosa; 45 pp. 2008. (accessed 10 24, 2016).
51. Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama, S. Tachikawa, and T. Suzuki. "Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence." Elsevier Science; Theriogenology 48 pp 769-774 . 1997. (accessed 10 25, 2016).
52. Padilha, Luciana Cristina, and Wilter Russiano. "MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS DE OVELHAS SANTA INÊS SUBMETIDAS A SUCESSIVAS SESSÕES DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA." UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"; 102 pag. 2012.
http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98151/padilha_lc_me_jabo.pdf?sequence=1&isAllowed=y (accessed 09 30, 2016).
53. Petyim, S., R. Bage, T. Hallap, A. Bergqvist, H. Rodriguez, and B. Larsson. "Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function." Theriogenology, 60; pag 175–188. 2003. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013638> (accessed 09 15, 2016).
54. Poto, A., L. Almela, B. Peinado, and S. Ruiz. "Respuesta a las técnicas reproductivas de las razas en peligro de extinción." Actas Iberoamericanas de Conservación Animal; pag 29-40. 2013. (accessed 09 15, 2016).
55. Reis, A., R. Metelo, P. Santos, and F. Moreira da Silva. "Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro." Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 43, n. 5, pp. 629-636. 2006. (accessed 11 3, 2016).
56. Rizos, Dimitrios, et al. "Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro." Theriogenology; 63; pp 939-949. 2005. (accessed 11 2, 2016).
57. Rodgers, R. J., and H. F. Irving. "Morphological classification of bovine ovarian follicles." Society for Reproduction and Fertility; pp 309-318. 2010. (accessed 10 24, 2016).
58. Rodríguez, Luis. "Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro." Vers. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela; 134 pag. 2013. (accessed 09 14, 2016).
59. Sasamoto, Yoshihiko, Minoru Sakaguchi, Seiji Katajiri, Yutaka Yamada , and Yoshiyuki Takahashi. "The effects of twisting and type of aspiration needle on



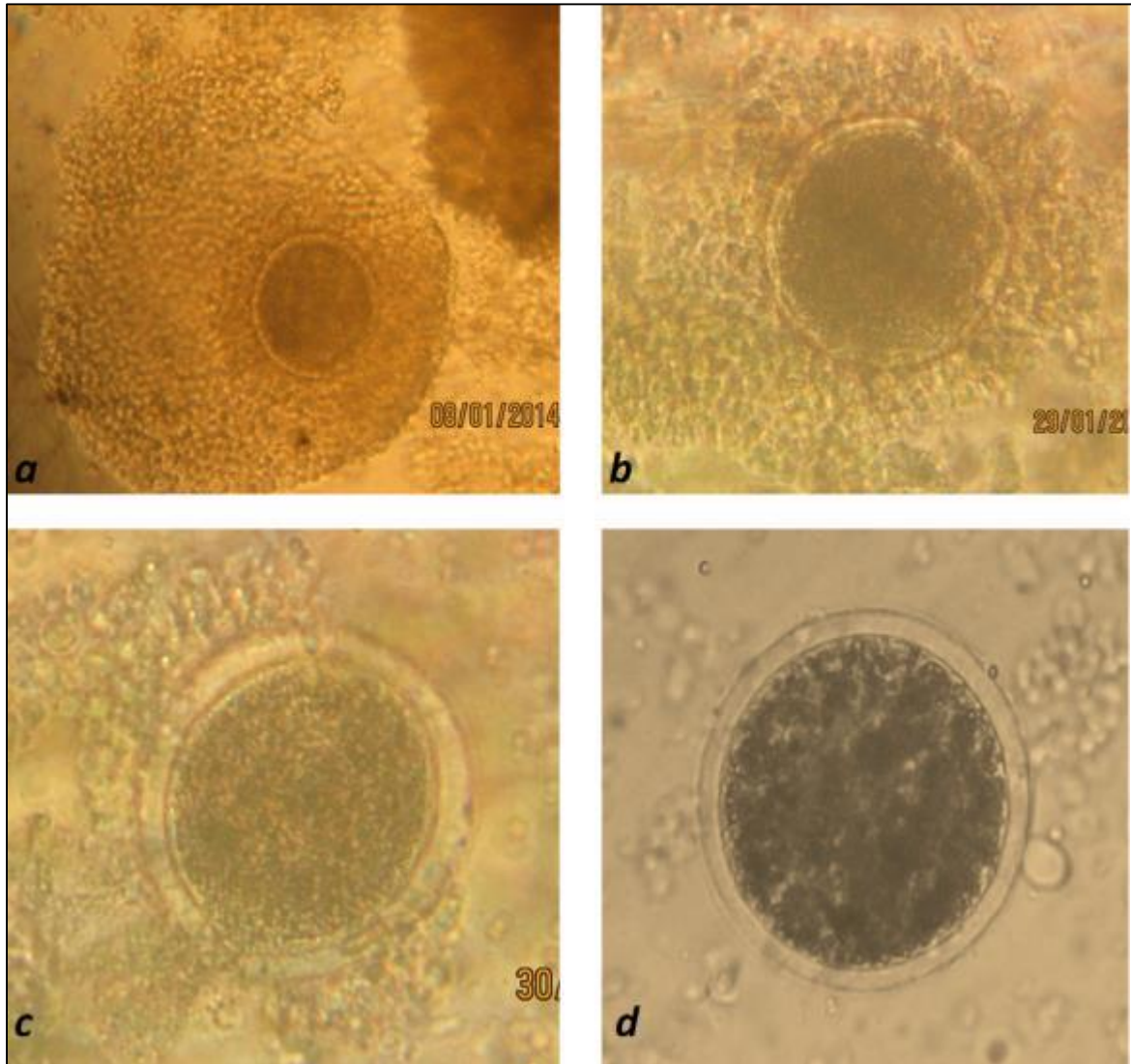
- the efficiency of transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle." *Journal Veterinary Medicine Science; Theriogenology* 65; pag 1083-1086. 2003. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/65/10/65_10_1083/_pdf (accessed 09 15, 2016).
60. Sendag, Sait, Yunus Cetin, Muhammet Alan, Klaus-Gerd Hadelers, and Heiner Niemann. "Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows." *Animal Reproduction Science*; 106; pp 208-214. 2008. (accessed 11 3, 2016).
61. Snijders, S. E. M., P. Dillon, D. O'Callaghan, and M. P. Boland. "Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cow." *Theriogenology*; 53; pp 981-989. 2000. (accessed 11 2, 2016).
62. Strober, Warren. "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability." *Current protocols in immunology*. 11 8, 2015. (accessed 11 6, 2016).
63. Sutton, M. L., R. B. Gilchrist, and J. G. Thompson. "Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity." *European Society of human reproduction and embryology*; Vol.9, No.1 pp. 35- 48. 2003. (accessed 10 12, 2016).
64. Van Soom, A., S. Tanghe, I De Paw, D. Maes, and A. de Kruif. "Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization." *Reprod Dom Anim* 37; pag 144–151. 2002. (accessed 09 18, 2016).
65. Van Wagendonk, A. M. "Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status." *Science Direct; Theriogenology* 65; pag 914–925. 2006. (accessed 09 30, 2016).
66. Vasquez, Noemí, Manuel Pérez, Luis Olivera, and Ury Pérez. "Efecto de dos Métodos de Colección sobre la Cantidad y Calidad Ovocitaria de Alpacas (*Vicugna pacos*) y Llamas (*Lama glama*) POSTMÓRTEM." *Vers. ISSN: 2306-8582. Revista de Investigaciones Alto Andino*; Vol 17; pp 331-340. 2015. <http://huajsapata.unap.edu.pe/ria/index.php/ria/article/view/144> (accessed Marzo 30, 2016).
67. Walsh, S. W., E. J. Williams, and A. C. O Evans. "A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows." *Animal Reproduction Science*; 123; pp 127-138. 2011. (accessed 11 2, 2016).



68. Walsh, S. W., et al. "Heritability an impact of environmental effects durin pregnancy on antral follicle count in cattle." *Journal of Dairy Science*; 97; pp 1-9. 2014. [http://dx.doi.org/ 10.3168/jds.2013-7758](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7758) (accessed 11 3, 2016).

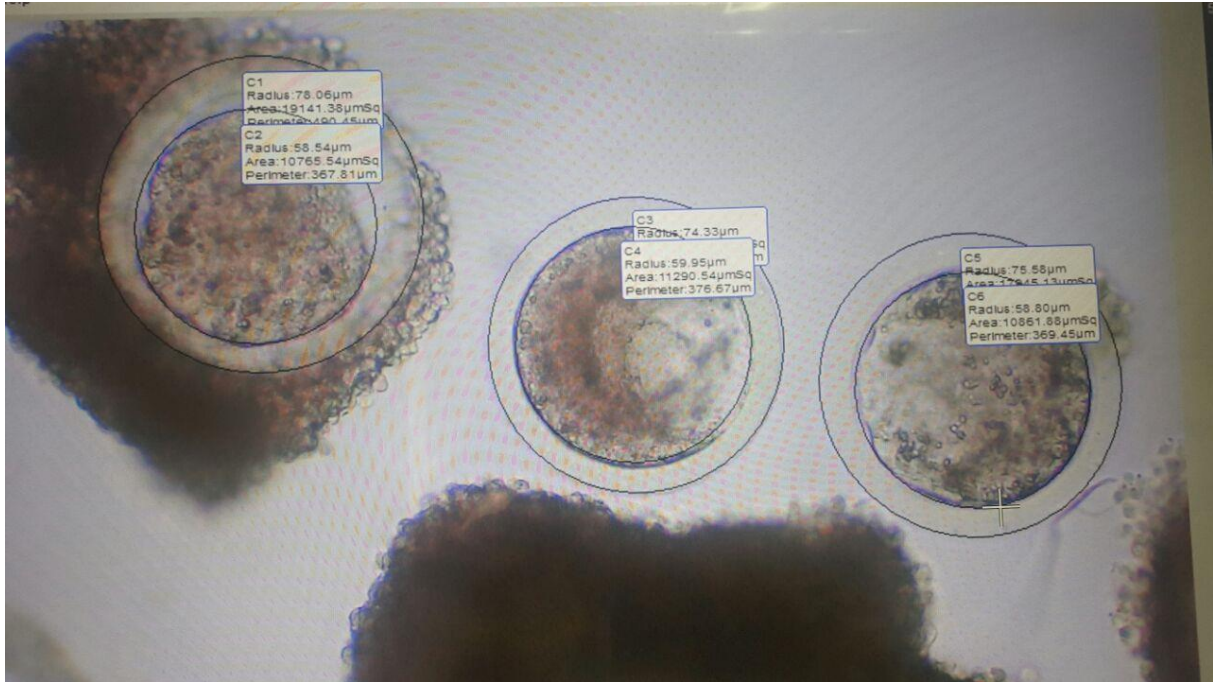
ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de ovocitos empleada por algunos investigadores.



Fuente: (Kouamo, et al. 2014)

Anexo 2. Medicion de ovocitos en laboratorio de irquis.



Fuente: (El Autor 2016)

Anexo 3. Obtencion de ovarios de matadero en EMURPLAG.



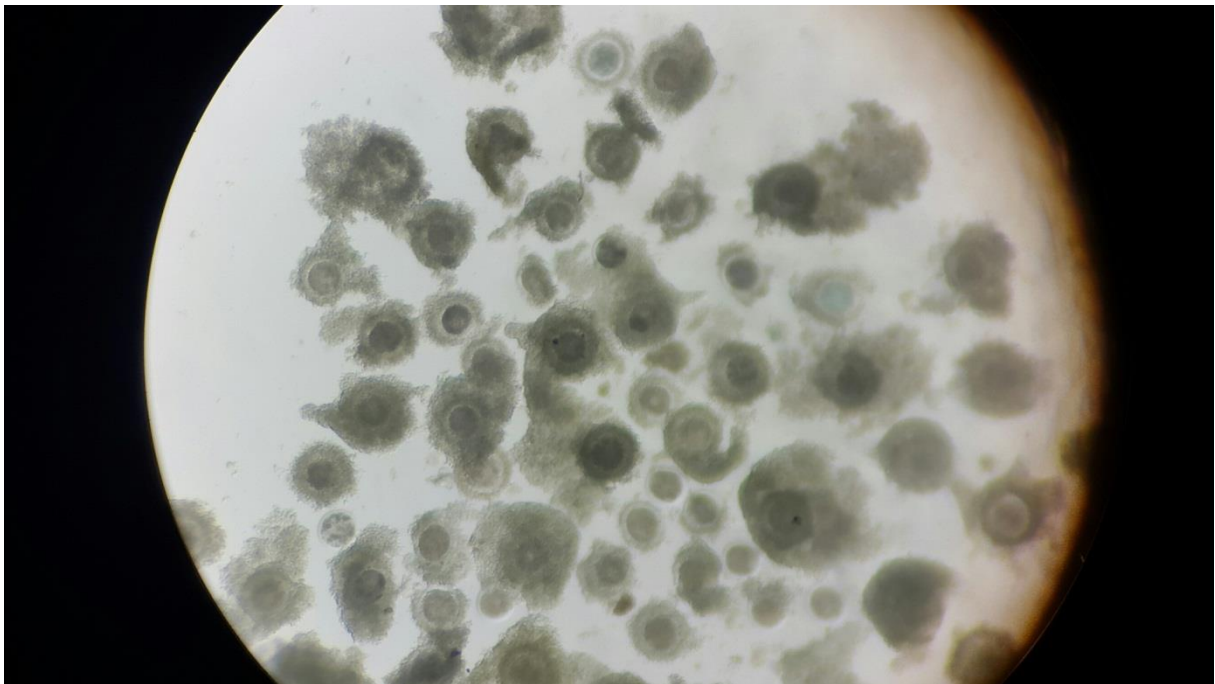
Fuente: (El Autor 2016).

Anexo 4. Obtencion de ovarios de matadero en EMURPLAG.



Fuente: (El Autor 2016).

Anexo 5. Obtecion de ovocitos en laboratoriode IRQUIS.



Fuente: (El Autor 2016).

Anexo 6. Ovocito con coloracion vital.



Fuente: (El Autor 2016).



Anexo 7. Vaconas con biotipo criollo en graja de IRQUIS.



Fuente: (El Autor 2016).