



Evaluación de dos medios para la maduración de ovocitos *in vitro* en ganado bovino (*Bous taurus*) en condiciones de altura

Evaluation of two means for the maturation of *in vitro* oocytes in bovine cattle (*Bous taurus*) in height conditions

Kevin Edson Carazas Loayza y Celso Ayala Vargas

RESUMEN:

La biotecnología de la reproducción comprende a las técnicas (desde la inseminación artificial (IA) hasta la clonación), las posibilidades de aplicación de la tecnología *in vitro* son múltiples y presentan un elevado interés para su aplicación en el ganado bovino. En la investigación el objetivo principal fue evaluar dos medios de maduración de ovocitos bovinos en condiciones de altura en el altiplano boliviano a una altitud de 3870 m.s.n.m., la obtención de ovocitos se realizó colectando ovarios del matadero municipal del El Alto, los ovocitos fueron colectados utilizando la técnica punción y aspiración con jeringas de 5 ml y agujas 18G, una vez que se encontraba ovocitos de categorías A, B, C y D, esta se las ponía a madurar en un tipo tapper rectangular de plástico de 500 ml de volumen durante 24 horas a baño maría a una temperatura de 38.5 °C en Líquido folicular Con Hormona LH, Medio sintético TCM-199 y un testigo Líquido Folicular Sin Hormona. En esta investigación se evaluó: El porcentaje de maduración de ovocitos, El porcentaje de maduración nuclear, El porcentaje de recuperación de ovocitos, Numero de folículos por Ovario, Número de Ovocitos por Vaca, Tamaño Folicular, Cantidad de Líquido Folicular, finalmente se realizó el análisis económico.

PALABRAS CLAVE:

Maduración *in vitro*, recuperación de ovocitos, maduración nuclear, ovocitos.

ABSTRACT:

The biotechnology of reproduction includes the techniques (from artificial insemination (AI) to cloning), the possibilities of application of *in vitro* technology are multiple and are of great interest for its application in cattle. In the research the main objective was to evaluate two means of maturation of bovine oocytes in high altitude conditions in the Bolivian highlands at an altitude of 3870 m.s.n.m., the oocyte collection was made by collecting ovaries from the El Alto municipal slaughterhouse, the oocytes were collected using the puncture and aspiration technique with 5 ml syringes and 18G needles, once oocytes of categories A, B, C and D, were found, they were put to maturity in a 500 ml volume rectangular plastic tapper type for 24 hours in a water bath at a temperature of 38.5 °C in Follicular Liquid With Hormone LH, TCM-199 Synthetic Medium and a Hormone-Free Follicular Control. In this investigation we evaluated: The percentage of maturation of oocytes, The percentage of nuclear maturation, The percentage of recovery of oocytes, Number of follicles per ovary, Number of oocytes per cow, Follicular size, Amount of follicular fluid, Finally the economic analysis.

KEYWORDS:

In vitro maturation, oocyte retrieval, nuclear maturation, oocytes.

AUTORES:

Kevin Edson Carazas Loayza: Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. kevin_ecl@hotmail.com

Celso Ayala Vargas: Docente Carrera de Ingeniería Agronómica. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. celsoayalavargas@hotmail.com

Recibido: 15/02/19.

Aprobado: 15/03/19.



INTRODUCCION

El ganado bovino es considerado el pilar fundamental de la producción pecuaria en todas o casi todas las áreas del planeta gracias a sus peculiaridades en el tubo digestivo que les permiten transformar las materias vegetales en proteínas de alto valor biológico además de otras producciones importantes.

La biotecnología de la reproducción comprende a las técnicas (desde la inseminación artificial (IA) hasta la clonación), que permiten aumentar la eficiencia reproductiva de los animales. Es uno de los productos más emblemáticos de la

investigación del control y dominio de las ciencias de la vida y la zootecnia, porque logro incrementar con éxito, el progreso genético de los hatos, destinados a la producción de carne, leche, a través de las tecnologías aplicadas comercialmente desde mediados del siglo XX.

Se han formulado una gran cantidad de medios de cultivo cuya composición y finalidad es asegurar el mantenimiento de los requisitos metabólicos y energéticos que el oocito necesita para su maduración fuera del folículo ovárico, todos los medios de maduración llevan formulaciones

complejas de aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas, nucleótidos, etc. Se utilizan en mayor o menor medida, para los procesos de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* por diversos equipos. La importancia del medio de cultivo para la maduración de los oocitos *in vitro* es tal que, según algunos autores, condiciona el éxito de los sistemas de fecundación y el posterior desarrollo *in vitro* de los embriones (Rose y Bavister, 1992).

Todo el sistema de producción *in vitro* requiere la maduración de los ovocitos, de cuyo éxito depende de el para una buena fertilización. Los ovocitos inmaduros pueden madurar en un cultivo *in vitro* bajo condiciones adecuadas cumpliendo un papel fundamental para la obtención de una mayor tasa de ovocitos fertilizados (Ahuja, et al. 2009).

Uno de los estudios más destacados fue realizado por Sreenan (1970) en bovinos, quien utilizó semen de toro pre incubado en un medio con α -amilasa con el propósito de intentar fecundar *in vitro* a ovocitos madurados *in vitro*. Sin embargo, fueron Iritani y Niwa (1977) en Japón, quienes lograron finalmente la fecundación *in vitro* de ovocitos bovinos madurados en cultivo.

Evalutando la eficacia del sistema con el nacimiento de crías unos años más tarde el trabajo de Brackett et al., (1993), provocó un gran impacto ya que informaba del nacimiento en E.E.U.U. del primer ternero producido mediante fecundación *in vitro* de ovocitos ovulados y recuperados del oviducto.

Por tal motivo se realizó la Evaluación de dos medios de maduración de ovocitos *in vitro* en ganado bovino (*Bous taurus*) en condiciones de altura.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de criopreservación de semen de la Estación Experimental de Choquenaira dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, Se encuentra ubicado geográficamente entre los paralelos 16°42'5" de latitud sur y 68°15'15" de longitud oeste y una altitud de 3870

msnm., a 32 km sur - oeste de la ciudad de La Paz y a 6 km de la población de Viacha.

Material Biológico Ovarios: Los ovarios fueron recuperados de vacas sacrificadas del matadero municipal Los Andes del municipio de El Alto, para la colecta de ovarios no se consideró el ciclo estral, la raza, la edad ni vacas en gestación.

Equipos de laboratorio: Baño maría, Microscopio, Estereoscopio, Balanza Analítica, Centrifugadora, Micropipetas, Placa Térmica, Refrigerador, Incubadora Portátil.

Materiales de laboratorio: Aguja 18G, Jeringas, Pinzas, Termo de transporte de ovarios, Cajas Petri, Matraz Erlenmeyer, Tubos de ensayo, Termómetro, Tijeras, Gradillas, Vaso Precipitado.

Insumos: Agua ultra pura, Medio de cultivo sintético TCM-199, Hormona LH, Líquido folicular, Heparina, Solución Buffer Fosfato Salino (PBS), Gonadotrofina Coriónica equina (eCG).

Otros materiales utilizados: Papel grueso, Papel filtro, Ligaduras, Bolsas nylon 30x10 cm.

Metodología Experimental

Recuperación de ovarios del matadero se realiza una vez que los animales pasaban por la sala de faena, luego pasaban por el sector de eviscerado, es donde se procedía a recoger los úteros de las vacas recién faenadas para luego con la ayuda de tijeras extraer los ovarios.

Los ovarios colectados se los pone en bolsas de polietileno de 10 x 35 cm, estas bolsas contiene suero fisiológico (0.9% Na Cl) más antibiótico, todo se los almacenaba en termos donde la temperatura en que se encontraba los ovarios en el termo es de 39 °C simulando la temperatura corporal de la vaca.

Para la Colección de Ovocitos se realizó el método de aspiración el cual con una jeringa de 5 ml y agujas de 18 G se buscaba de cada ovario aquellos folículos que median más de 2 mm de diámetro para

aspirar esos folículos y así obtener buenos ovocitos de categorías A, B, C y D.

Cada punción que se daba al folículo se aspiraba el líquido folicular más los ovocitos, esta aspiración de folículos se la vertía a tubos de ensayo que previamente están atemperados en baño maría a 38.5 °C, dejando reposar toda la concentración aspirada en los tubos de ensayo por un lapso de 10 – 20 minutos, esto con el fin de que por gravedad se sedimente en la superficie del tubo de ensayo los ovocitos.

Una vez que se tiene líquido folicular y ovocitos en los tubos de ensayo se procede a eliminar el líquido folicular sobrante aspirando con jeringas de 5 ml, los ovocitos sedimentados en los tubos de ensayo son lavados con Solución Buffer Fosfato Salino para no dañar los ovocitos todo atemperado a 38.5°C.

La selección y clasificación de ovocitos se realiza en cajas Petri donde se observa aquellos ovocitos que tienen capas de células del cumulus, citoplasma completa, núcleo bien definido, con un estereoscopio 20x.

Para la clasificación de ovocitos se tomó en cuenta las recomendaciones de (Leibfried y First, 1979).

La preparación de materiales y acondicionado del taper se tomó la recomendación de Suzuki, et al. (1999), que se trabaja con un taper de plástico donde no existe ingreso y salida de aire. La tapa del envase se acondiciona introduciendo en uno de los extremos una goma, que fue adherida con pegamento especial, al medio de esta goma fue introducida una aguja 18 G que esta se conecta a una ligadura de 15 cm de largo esto con el fin de controlar la salida de oxígeno y dar ingreso a la adición de agua destilada para obtener CO₂ controlando la ligadura con pinzas hemostáticas que sirven como válvulas.

El taper contiene una caja Petri 60 x 15 mm que dentro de ella contiene 4 gotas de

aproximadamente 100µl del medio de maduración cubiertas con aceite mineral.

Una vez tapado el envase se procedió a extraer 25 ml de aire del interior del taper, se aseguró con la pinza hemostática la ligadura acondicionada al envase, el CO₂ requerido (5%) se obtuvo por adición de 5 ml de agua destilada a 0,25 g de granulo efervescente dentro de un pequeño envase de plástico el cual liberaba CO₂ dentro de la incubadora portable.

Preparación del medio de Maduración Líquido Folicular más Hormona LH: se obtiene de los tubos de ensayo de los ovarios aspirados, una vez que se separa el líquido folicular se lleva a la centrifugadora durante 15 min a 3500 R.P.M. Traspasar a alícuotas con 1 ml de líquido folicular esta complementar con 10 µl de Hormona LH + 1 µl de Heparina, agitar toda la mezcla suavemente, medir el PH del medio de maduración que debe estar a 6.9 y 7.3 de PH, todo el medio debe estar atemperado a 38.5 °C.

Medio sintético TCM-199: Pesar en una balanza analítica TCM 0.302 gr esta mezclar con 20 ml agua ultra pura, agitar suavemente hasta que se disuelva totalmente, medir el PH y estandarizar hasta obtener 7.1 - 7.4. La estandarización se la realiza con hidróxido de sodio. Para proceder a la mezcla extraer 1 ml de TCM-199, añadir 4 µl de gonadotropina coriónica equina (Novormon) + 10 µl de Hormona LH, todo el medio debe estar atemperado a 38.5°C.

Maduración de ovocitos: Los ovocitos seleccionados que se encuentran en las cajas Petri con PBS son llevados cuidadosamente con las micropipetas a las gotas de maduración, la caja Petri que contiene el medio de maduración más los ovocitos son introducidos al taper.

El medio del taper fue acondicionado a 38,5°C con 5% de CO₂, siguiendo el procedimiento de preparación de materiales y acondicionamiento.

Para finalizar este proceso el taper es introducido a baño maría a 38.5°C durante 24 horas.

Evaluación Morfológica de la Maduración

La evaluación de maduración de ovocitos se procede a realizar pasada las 24 horas, se extrae el tapper del baño maría e inmediatamente una vez que se abre el tapper se extrae la caja Petri donde se encuentran los ovocitos estos son llevados a la placa térmica para que esta siga en temperatura de 38.5 °C, la evaluación se realizó tomando en cuenta los criterios que aseguran que ha ocurrido la maduración *in vitro* (Ducibella et al., 1988), Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II, Expansión y mucificación del cúmulo celular, Traslado de los gránulos corticales a la periferia del oocito, Desaparición de las uniones intercelulares.

Evaluación porcentaje de recuperación Ovocitos

Se realizó contando todos los ovocitos que fueron aspirados usando la técnica punción y aspiración, se seleccionó las categorías (A, B, C y D), para la clasificación y evaluación de ovocitos se tomó en cuenta las recomendaciones de (Leibfried y First, 1979), también se observó y se contó aquellos ovocitos que presentaban deficiencias, como ser: cumulus celular incompleto, zona pelucida rota o sin contenido citoplasmático y degeneración en algunas partes del citoplasma.

Análisis Estadístico

Los datos que se obtuvo en la maduración *in vitro* de ovocitos fueron analizados en un Diseño Completamente Aleatorio (D.C.A) Bi Factorial, tomando en cuenta como Factor 1 las categorías de ovocitos (A, B, C y D) y como Factor 2 los medios de maduración de ovocitos (Líquido Folicular con Hormona LH, Líquido Folicular sin Hormona (Testigo) y medio de maduración sintético TCM-199).

Para el porcentaje de recuperación de ovocitos se utilizó el modelo Diseño Completamente Aleatorio donde se tomó en cuenta la técnica de Recuperación de ovocitos (Punción y Aspiración), sobre las categorías de ovocitos (A, B, C y D).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Porcentaje de maduración de ovocitos

Se obtuvo el mejor tratamiento, el medio sintético TCM-199 que llegó a alcanzar un porcentaje de maduración del 44.73%, con respecto al medio de maduración Líquido Folicular Con Hormona LH se llegó a alcanzar un porcentaje de maduración del 31,71% y con el Medio Líquido Folicular Sin Hormona (Testigo), solo alcanzo un 30,77% de maduración de ovocitos.

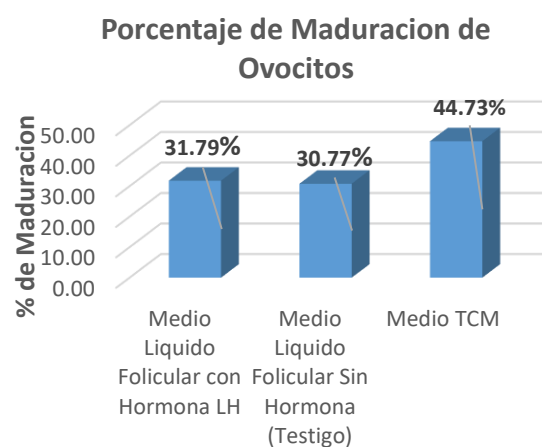


Figura 1. Porcentaje de maduración de ovocitos con tres medios de maduración de ovocitos.

El resultado obtenido en la investigación es superior, ya que se logró 44,73% de maduración de ovocitos utilizando el medio de cultivo sintético TCM-199 suplementado por hormona Luteinizante (LH) y GnRH (eCG), también atribuimos que utilizó mayor cantidad de ovocitos en nuestro estudio según Fernández, et al. (2010), recupero 670 ovocitos por punción y aspiración, los ovarios fueron obtenidos en mataderos, los cuales se cultivaron en medio TCM-199. De 302 ovocitos recuperados por punción y aspiración, 97 maduraron representando 32.1% de maduración de ovocitos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la investigación, con 44,73% de maduración de ovocitos, son superiores a los resultados encontrados por (Gonzales et al., 2005), donde utilizo bolsas gasificadas que contenían en su interior 5% CO₂, 95%

N₂ y 5% O₂, que fueron sumergidas dentro de un sistema de incubación bajo el agua (baño María) a 38,5 °C utilizando como medios para la maduración de ovocitos TCM-199 adicionado con 15% de SFB, eCG y hCG se obtuvo una tasa de maduración del 39.8%.

Maduración Nuclear

En esta investigación se trabajo con 724 ovocitos distribuidos por categorías de ovocitos (A, B, C y D), se seleccióno 180 ovocitos de categoría A, donde 47 ovocitos se evaluaron con Liquido Folicular Con Hormona LH, 60 ovocitos fueron evaluados con Liquido Folicular Sin Hormona (Testigo) y 73 ovocitos con el medio sintético TCM-199.

De los ovocitos que se evaluaron con Liquido Folicular Con Hormona LH solo llegaron a la maduración nuclear 7 ovocitos representando el 14.86%, con el medio Liquido Folicular Sin Hormona (Testigo) 10 ovocitos llegaron a la maduración nuclear representando 16.67%, el mejor medio de maduración de ovocitos que hizo llegar a una maduración nuclear es el medio sintético TCM-199 que maduraron 26 ovocitos representando un 35.62%.

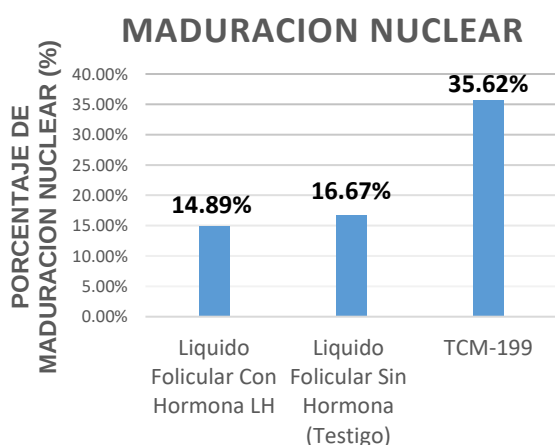


Figura 2. Porcentaje de Maduración Nuclear de ovocitos.

El estudio realizado por (Salgado et al., 2010) en Montería, Colombia, se evaluó el efecto de las hormonas FSH y LH sobre la maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos, donde el

medio de maduración base fue TCM-199 suplementado con FSH y LH. Demostraron que la FSH o LH sola o en combinación inducen altas tasas de maduración de ovocitos bovinos *in vitro* ya que en ausencia de las gonadotropinas solo el 36,43% alcanza la maduración nuclear lo cual indica la importancia de estas hormonas para una adecuada maduración, las mayores tasas de maduración *in vitro* fueron alcanzados cuando el medio de maduración contenía una mayor proporción de LH 150 µg/ml y 50 µ/ml de FSH, este resultado en el porcentaje de maduración nuclear de ovocitos, es ligeramente mayor en el presente estudio donde utilizamos 10 µl de LH y de 4 µl de GnRH (eCG) y obtuvimos 35.62%, esto lo atribuimos a que se utilizó mayores proporciones de cantidad de hormonas LH y GnRH (eCG) en las proporciones del medio de maduración sintético TCM-199.

Porcentaje de Recuperación de Ovocitos

Para el porcentaje de recuperación de ovocitos, se observó las características y aspectos del citoplasma, se contó el número de capas que rodean al ovocito para poder separar a las distintas categorías de ovocitos (A, B, C y D), se pudo obtener un porcentaje de recuperación del 82,09% el cual representa 724 ovocitos los cuales fueron evaluados, la recuperación de ovocitos se utilizó la técnica punción y aspiración, el resto de ovocitos aspirados que cuenta con 17,91% el cual representa 158 ovocitos, no fueron evaluados por distintas características como ser: cumulus celular incompleto, zona pelucida rota o sin contenido citoplasmático, ovocitos vacuolizados, degeneración en algunas partes del citoplasma.

Según Rizos A. (2007), la recolección de oocitos que provienen de animales (jóvenes, vacas productoras de leche, vacas de carne) permiten incrementar el número de embriones potenciales y de terneros producidos por donadora/año obtenidos por procedimientos *in vitro*, y los que mejores resultados que se tienen es por punción aspiración con 84 % y 38 %, sin embargo comparando con los resultados de nuestro estudio se tiene una similitud teniendo

82,09% de recuperación de ovocitos utilizando la técnica de punción y aspiración, los cuales fueron

clasificados y evaluados por cada categoría ovacitoria que presenta las células del cumulus.

Tabla 1. Detalle del número de ovocitos trabajados y encontrados

Nº de Ovarios	Nº de Ovocitos Recuperados	Categoría de ovocitos	Nº de Ovocitos evaluados	Nº Ovocitos recuperados no evaluados	Porcentaje de Ovocitos Evaluados (%)	Porcentaje de Ovocitos Recuperados No Evaluados (%)
538	882	A	175	41	19,84%	4,65%
		B	199	35	22,56%	3,97%
		C	194	38	22,00%	4,31%
		D	156	44	17,69%	4,99%
Sub Total			724	158	82,09%	17,91%
Total			882		100%	

Al respecto Lonergan, et al. (1991) y Herlerr, et. al. (1992), indican que en mejores condiciones recolectando ovocitos por aspiración de folículos se puede alcanzar porcentajes cercanos al 70%. Con respecto a la investigación realizada en la recuperación de ovocitos, se alcanzó un 82,09%, este resultado obtenido se debe a que se utilizó y realizo correctamente la técnica punción y aspiración para la recolección de ovocitos.

Folículos por ovario

Se extrajeron 538 ovarios del matadero municipal “El Alto” los cuales se aspiró 6354 folículos teniendo como resultado promedio 11.81 folículos/ovario, este resultado que se obtuvo es superior a (Pavlov et al., 1992), que obtuvo un promedio de 6,3 folículos/ovario, aunque, también es ligeramente inferior a los trabajos realizados por Lonergan et al., (1991) que obtuvo 14,6 folículos/ovarios. La mayoría de los estudios realizados indican que existe una variabilidad de folículos por ovario, esta variación de folículos es probablemente debido a la procedencia del animal, la edad y a las condiciones que presentan los animales a la hora del sacrificio.

Número de Ovocitos por Vaca

En la investigación fueron evaluados 882 ovocitos de 269 vacas, se obtuvo 3.28 ovocitos por vaca siendo inferiores al de Rea et al., (2001) donde

hace referencia que obtuvieron 12,1 ovocitos por vaca, también en otro estudio realizado por Gordon (2003), quien indica que se obtiene una media de 14,3 ovocitos por vaca y 15 ovocitos por vaca obtenido por Palma et al., (1993), las causas de este bajo resultado en nuestro estudio en el número de ovocitos por vaca probablemente son porque en el estudio realizado no se consideró las condiciones físicas, ciclo estral y alimentación del animal, tampoco la edad de la vaca cuando se realizó la colecta de ovarios del matadero.

Adamiacks, et al., (2005), realizaron estudios donde indican que la condición corporal y el nivel de alimentación de la vaca donante influyen en una serie de factores que regulan el desarrollo folicular ovárico, la proliferación de las células de la granulosa y la esteroidogénesis, del mismo modo los altos niveles de alimentación también tienen un efecto perjudicial sobre la calidad de los ovocitos con bajas tasas de fertilización en ovinos y vacunos, en cuanto al presente estudio, realizamos la colecta de ovarios del matadero no se pudo saber la procedencia y tampoco la condición alimenticia en la que se encontraba la vaca sacrificada, el cual puede ser otro factor que afecta en el número de ovocitos/vaca obtenidos en esta investigación.

Tamaño de los folículos del ovario

En el cuadro se puede apreciar las medidas de los diámetros foliculares y la cantidad de líquido

folicular que contiene los ovarios. Con los resultados que se obtuvo podemos decir que a mayor tamaño de los folículos se tiene mayor cantidad de líquido folicular la medida de los folículos se realizó desde 1mm que es el folículo más pequeño, hasta aquellos folículos más grandes que alcanzaron a medir 35 mm de diámetro folicular, los folículos de 1mm hasta los folículos de 7mm de diámetro se obtuvo 0 ml de líquido folicular. (ver tabla 2)

Tabla 2. Detalle de tamaño y liquido folicular en el ovario.

Tamaño Folicular (mm)	Cantidad de Líquido Folicular (ml)
8 mm	0,2 ml
9 mm	0,3 ml
10 mm	0,4 ml
11 mm	0,4 ml
12 mm	0,5 ml
13 mm	0,6 ml
14 mm	0,8 ml
15 mm	0,8 ml
16 mm	0,8 ml
17 mm	1,3 ml
18 mm	1,4 ml
19 mm	5,5 ml
22 mm	4,2 ml
23 mm	2,0 ml
25 mm	4,4 ml
30 mm	4,4 ml
35 mm	19,0 ml

Lonergan et al. (1992) consideran que el tamaño de los folículos está directamente relacionado con la capacidad de desarrollo ya que un mayor porcentaje de ovocitos obtenidos de folículos mayores de 6 mm son capaces de dar origen a embriones en comparación con los obtenidos de folículos de entre 2 y 6 mm. Midiendo los ovocitos encontramos que a mayor tamaño de folículos tenemos mayor liquido folicular es por eso que tenemos más probabilidad de encontrar ovocitos capaces de dar origen a nuevos embriones, en la investigación se evaluó el diámetro de los folículos y

se pudo evidenciar que a partir de 8 mm de folículo encontramos aproximadamente 0.2 ml de líquido folicular el cual este líquido mantendrá al ovocito con los requerimientos que necesita para madurar en el folículo del ovario, mientras que en un diámetro inferior a 7 mm no encontraremos liquido folicular el cual solo se encontrara ovocitos con deficiencias y mal formaciones estos ovocitos no serán aptos para una selección de maduración *in vitro*.

Costos de Producción Maduración *in vitro*

La maduración de ovocitos visto en las tablas 3 y 4. Permite obtener los costos de producción y entender mejor los resultados. (ver tabla 3)

Tabla 3. Costo Total.

DESCRIPCIÓN	UNIDAD	CANTIDAD	PRESIO UNITARIO	COSTO TOTAL
A. LIMPIEZA DE LABORATORIO				59
Detergente	ml	1	12	12
Toalla	cm	3	5	15
Algodón	gr	2	16	32
B. INSUMOS Y MATERIALES				2351,2
B.1. INSUMOS				1372,8
Agua ultra pura	ml	1	30	30
Medio de cultivo TCM-199	gr	1	600	600
Hormona LH	ml	1	85	85
Líquido folicular	ml	-	-	-
Heparina	ml	1	45	45
Lavado de ovocitos PBS	ml	1	210	210
Gentamicina	ml	1	2,8	2,8
Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG o PMSG)	ml	1	400	400
B.2. Materiales de Laboratorio				978,4
Taper	ml	4	25	100
Agujas 18G	pza	1	25	25
Jeringas	pza	200	1	200
Pinzas	pza	3	35	105
Termo de transporte de ovarios	ml	1	40	40
Termo de transporte de agua para Baño	ml	1	55	55
Cajas Petri	pza	8	19,8	158,4
Tubos de ensayo	ml	6	2,5	15
Termómetro	pza	1	55	55
Tijeras	pza	2	35	70
Gradillas	pza	1	8	8
Vaso de precipitación	ml	2	45	90
Papel grueso	gr	4	10	40
Papel Filtro	gr	4	3	12
Ligaduras	pza	1	5	5
C. TRANSPORTE				846
Diario	bs	36	23,5	846
Costo total (A+B+C)				4234,6

Tabla 4. Detalle de resultados.

Detalle	Costo
Rendimiento de Ovocitos	3,28 ovocitos/vaca
Ovocitos Llegados a la Maduración Nuclear	43 ovocitos
Costo de Ovocito Maduro	96,16 bs/ovocito
Costo Total	4234,6 bs

Valor Bruto de Producción

$$(VBP) = RDTO * COSTO DE OVOCITO$$

$$(VBP) = 315,40 \text{ Bs/ovocito}$$

Ingreso Bruto

$$(IB) = (VBP) - (CT)$$

$$(IB) = 3919.2 \text{ Bs}$$

Beneficio Costo

$$(B/C) = IB/CT$$

$$(B/C) = 0.92 \text{ Bs/ovocito}$$

La maduración *in vitro* de ovocitos, el costo beneficio es 0.92 Bs/ovocito, este resultado nos indica que no es rentable la producción de ovocitos madurados, ya que por cada boliviano invertido solo recuperamos 0.92 Bs. Este resultado se atribuye que es por la baja cantidad de ovocitos/vaca encontrados, probablemente por las edades de las vacas entre jóvenes y adultas, la alimentación de cada vaca, el ciclo estral en la que se encuentra u otras deficiencias fisiológicas que presentan las vacas cuando llegan al sacrificio.

CONCLUSIONES

En la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos realizados en condiciones de altura en la Estación Experimental de Choquenaira perteneciente a la Facultad de Agronomía se obtuvieron los siguientes resultados:

En cuanto a la maduración *in vitro* al utilizar dispositivos no convencionales en laboratorio en condiciones de altura, utilizando dos medios de maduración de ovocitos se determinó que el mejor medio de maduración *in vitro* de ovocitos fue el medio sintético TCM-199 llegando a alcanzar 44,73% de maduración de ovocitos estos resultados son favorables a los resultados comparados que fueron reportados a nivel del mar.

En la maduración de nuclear de ovocitos se obtuvo 35,62% utilizando el medio de maduración sintético TCM-199 estos porcentajes son menores e intermedios a la literatura citada. Se obtuvo un porcentaje de recuperación de ovocitos de un 82,09% utilizando la técnica Punción y Aspiración siendo mejores que los autores citados.

En la clasificación morfológica de ovocitos se evaluó 175 ovocitos de categoría A, 199 ovocitos de categoría B, 194 ovocitos de categoría C y 156 ovocitos de categoría. Se obtuvo 3,28 ovocitos por vaca siendo un resultado inferior a los obtenidos por la literatura citada.

El número de folículos por ovario como promedio obtuvimos 11,81 folículos por ovario, siendo intermedio a la literatura citada. el tamaño de los folículos se obtuvo diámetros foliculares que miden desde 1 milímetro de diámetros hasta folículos más grandes que alcanzan los 35 milímetros de diámetro folicular por ovario, siendo mayor tamaño el folículo mayor será la cantidad de líquido folicular encontrado en cada folículo.

El costo beneficio es 0.92 Bs/ovocito, este resultado indica que no es rentable la producción de ovocitos madurados *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adamiacks, J., Mackie, K., Wati, R. G., Webb, R., & Sinclair, K. D. (2005). Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. (Vol. 73). *Biology of reproduction*.

- Ahuja, A., Montiel, P., Pérez, H., & Gallegos, S. (2009). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos (Vol. 27). *Zootecnia Trop.*
- Brackett, B. G., & Zuelke, K. A. (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. (Vol. 39). *Theriogenology*.
- Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalbero, J., & Rangarajan, S. (1988). Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Devl. Biol.* 130.
- Fernández, R. F., Hernández, P. J., & Reyes, F. M. (2010). Maduración y fertilización in vitro de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. Recuperado de: <http://www.produccion-animal.com.ar>
- Gonzales, N., Huerta, L. M., Hoya, G. D., Espinosa, E., & Josa, A. (2005). Sistema de incubación en bolsas gaseadas: Alternativa al cultivo in vitro de embriones bovinos. Laboratorio de Biotecnología. Área de Obstetricia y Reproducción. Zaragoza, España.
- Gordon, I. (2003). Laboratory production of cattle embryos (Second ed.). (C. Publishing, Ed.) USA.
- Herlerr, A., Lucas-Hann, A., & Ntemann, H. (1992). Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro production of bovine embryos. *theriogenology* 37.
- Iritani, A., & Niwa, K. (1977). Capacitation of boíl spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. 1. (Vol. 50). *Reprod. Pert.*
- Leibfried, L., & First, N. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. (Vol. 48). *J. Anim. Sci.*
- Lonergan, P., Vergos, E. A., Kinis, H., Sharif, M., Gallagher, & I, G. (1991). The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for in vitro maturation. *Theriogenology*.
- Lonergan, P., Sharip, H., Monaghan, P., Wahid, H., Oallagher, M., & Gordon. (1992). Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture in vitro. (Vol. 37). *Theriogenology*.
- Palma, G., & et at. (1993). Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción. Múnich, Alemania.
- Pavlov, A., Lucas-Hann, A., & Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dey.* 31.
- Rea, M., J., C., Olivares, J., & Cubillo, P. (2001). Obtención de embriones por maduración y fertilización in vitro de oocitos bovinos. Instituto de genética. Universidad mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.
- Rose, T., & Bavister., B. (1992). Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. (Vol. 31). *Mol. Reprod. Dev.*
- Salgado, R., Vergara, O., & Ramirez, L. (2010). Efecto de las gonadotropinas sobre la maduración y desarrollo embrionario de ovocitos bovinos cultivados in vitro. (Vol. 15). *Rev. MVZ*
- Suzuki, T., Sumantri, C., Khan, N., MurakamI, & Saha, S. (1999). Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for in vitro production of bovine embryos. (Vol. 53). *Anim. Reprod. Sci.*