

**Efecto de la suplementación con cafeína en el
medio de fertilización sobre la producción *in vitro*
de embriones bovinos**

**Keyla Lizbeth Ponce Romero
Karen Mabel Rosero Frías**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2020**

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Efecto de la suplementación con cafeína en el medio de fertilización sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Keyla Lizbeth Ponce Romero
Karen Mabel Rosero Frías

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

Efecto de la suplementación con cafeína en el medio de fertilización sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos

Presentado por:

Keyla Lizbeth Ponce Romero
Karen Mabel Rosero Frías

Aprobado:



John Jairo Hincapié (Nov 5, 2020 08:14 CST)

John Jairo Hincapié, D.Sc.
Asesor Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



Isidro Matamoros (Nov 5, 2020 09:06 CST)

Isidro A. Matamoros, Ph.D.
Asesor



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano Académico

Efecto de la suplementación con cafeína en el medio de fertilización sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos

**Keyla Lizbeth Ponce Romero
Karen Mabel Rosero Frías**

Resumen. El medio de fertilización para la producción de embriones *in vitro* es importante para el desarrollo en etapas posteriores. El objetivo de este estudio fue determinar los porcentajes de fertilización, clivaje y embriones al día ocho al suplementar cafeína en el medio Fertilización *in vitro* (FIV). El estudio se realizó en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano en el laboratorio de Reproducción Animal entre julio 2019 y agosto 2020. Los tratamientos fueron: FIV + cafeína y FIV control. Se recolectaron 714 ovocitos de los cuales 337 ovocitos para el tratamiento FIV control siendo viable el 79.2% y para el tratamiento FIV + cafeína fueron 377 ovocitos con un porcentaje de viabilidad del 80.4% dando un promedio de 2.94 por ovario. El porcentaje de maduración no presentó diferencias ($P > 0.05$) con un 87.13% en el tratamiento cafeína y 85.02% en tratamiento control. Los resultados de las variables analizadas fueron para el porcentaje de fertilización 81.06 y 78.85%, clivaje 75.23 y 73.74%, apoptosis al tercer día 24.77 y 26.26%, y cigotos en apoptosis del cuarto al sexto día 29.81 y 31.06% para cafeína y control respectivamente, sin existir ninguna diferencia significativa ($P > 0.05$). Para el porcentaje de mórulas no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) obteniendo valores porcentuales total de 27.01 y 29.67% para el tratamiento cafeína y control respectivamente. De igual manera en la eficiencia del procedimiento de FIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, maduros, fertilizados y clivaje no hubo diferencia al suplementar cafeína.

Palabras clave: Apoptosis, blastocistos, clivaje, mórulas, ovarios.

Abstract. Fertilization media for *in vitro* embryo production is important for their later stages' developments. The main purpose of this study was to determine the percentages of fertilization, cleavage, and embryos at day eight when supplementing caffeine in the FIV medium. The investigation was carried out at Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, at the Animal Reproduction Laboratory between July of 2019 until August of 2020. The treatments were: IVF + caffeine and control IVF. 714 oocytes were collected, of which 337 oocytes for the control IVF treatment, 79.2% being viable and for the IVF + caffeine treatment there were 377 oocytes with a viability percentage of 80.4%, giving an average of 2.94 per ovary. The maturation percentage did not show differences ($P > 0.05$) with 87.13% in the caffeine treatment and 85.02% in the control treatment. The results of the analyzed variables were for the percentage of fertilization 81.06 and 78.85%, cleavage 75.23 and 73.74%, apoptosis on the third day 24.77 and 26.26%, and zygotes in apoptosis from the fourth to the sixth day 29.81 and 31.06% for caffeine and control respectively, without any significant difference ($P > 0.05$). For the percentage of morulae, there were no significant differences ($P > 0.05$) obtaining total percentage values of 27.01 and 29.67% for the caffeine and control treatment, respectively. Similarly, in the efficiency of the IVF procedure, relating the embryos produced with the viable, mature, fertilized and cleavage oocytes, there was no difference when supplementing caffeine.

Key words: Apoptosis, blastocysts, cleavage, morulae, ovaries.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Índice General	v
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	18
5. RECOMENDACIONES.....	19
6. LITERATURA CITADA	20
7. ANEXOS	23

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Preparación del medio de colección de ovocitos (MCO).....	4
2. Medio de maduración de ovocitos (MMO).....	4
3. Medio de capacitación y acondicionamiento	5
4. Preparación del medio 10X SP-TL para Percoll 90%.....	5
5. Preparación del Percoll 90%	6
6. Preparación del Percoll 45%	6
7. Preparación del medio de fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	6
8. Preparación de la solución stock de cafeína.....	7
9. Preparación del medio de Fluido Sintético de Oviducto (SOF).....	8
10. Número de ovarios procesados (NOP), ovocitos aspirados (OA), ovocitos viables (OV) y ovocitos degenerados (OD) de hembras bovinas para los tratamientos con cafeína y control	10
11. Porcentajes de ovocitos viables y madurados para los tratamientos con cafeína y control	12
12. Porcentaje de ovocitos fertilizados, en clivaje apoptosis al tercer y sexto día y embriones para los tratamientos con cafeína y control	13
13. Estadio y grado de los embriones obtenidos para los tratamientos con cafeína y control.....	16
14. Eficiencia del procedimiento de FIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje	17

Figuras	Página
1. Ovocitos degenerados	11
2. Ovocitos recolectados. Ovocitos clasificados según su morfología en categorías I, II, III y IV.....	11
3. Ovocitos antes y después de la maduración <i>in vitro</i> por 24 horas. Izquierda: inicio de la maduración <i>in vitro</i> (hora 0); Derecha: final de la maduración <i>in vitro</i> (hora 24)	12
4. Izquierda: grupos de presuntos cigotos sin clasificar, luego de 18 horas de fertilización <i>in vitro</i> . Derecha: ovocito fecundado. Nótese la extrusión del segundo cuerpo polar	14
5. Clivaje a las 72 horas en el tratamiento con cafeína	14
6. Clivaje a las 72 horas en el tratamiento control	15
7. Blastocistos en diferentes estadios: protruyendo (Bp), protruidos y expandidos (Be) en el tratamiento con cafeína.....	16
8. Blastocistos en diferentes estadios: protruyendo (Bp), protruidos y expandidos (Be) en el tratamiento control.....	16

Anexos	Página
1. Recolección de ovarios.....	23
2. Acondicionamiento de ovarios.....	23
3. Aspiración folicular.....	23
4. Búsqueda de ovocitos viables	24
5. Instrumentos utilizados	24
6. Medios de cultivo FIV.....	24
7. Tratamiento cafeína.....	25
8. Microgotas flotantes para maduración <i>in vitro</i>	25

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología de la reproducción ha experimentado un gran avance en la ciencia de nuevas herramientas capaces de manejar y modificar el genoma de los seres vivos más evolucionados. El avance de nuevas biotecnologías se enfoca en las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones, con el objetivo de crear nuevas líneas de animales genéticamente superiores (Peláez 2011). Estas tecnologías aceleran el progreso genético, reducen el riesgo de transmisión de enfermedades e incrementan la cantidad de animales a partir de un progenitor superior. Los procedimientos biotecnológicos son utilizados para aumentar la eficiencia y eficacia en la producción animal y la conservación de recursos genéticos dentro de las poblaciones (FAO 2010).

El término fecundación *in vitro* (FIV), permite la interacción de gametos femeninos y masculinos en un ambiente artificial (Filipiak y Larocca 2010). La producción de embriones *in vitro* se produce a través de medios de cultivo, tiempo y condiciones ambientales que simulan el escenario real de la madre receptora (Crespo y Guamán 2015). La fecundación de ovocitos consta de tres procedimientos específicos: Maduración *in vitro* (MIV), Fertilización *in vitro* (FIV) y Cultivo *in vitro* (CIV), los cuales son desarrollados en ambientes asépticos, estériles y en condiciones de temperatura, pH y CO₂ requerido en cada procedimiento (Urribarrí *et al.* 2012).

Los efectos de cada uno de los procedimientos y en especial de las reacciones acrosómicas de los espermatozoides son fundamentales en la penetrabilidad de los ovocitos y el desarrollo embrionario posterior. La composición del medio de FIV condiciona el desarrollo de la reacción acrosómica, siendo un proceso de fertilización al unir la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del espermatozoide (Gordon y Gadea 2003). Por otro lado, al realizar el proceso de MIV de ovocitos bovinos alrededor del 90% de los ovocitos inmaduros llegan a metafase II y expulsan el primer cuerpo polar, aproximadamente el 70-80% quedan fertilizados y se dividen hasta el estado de dos células. Sin embargo, sólo alrededor del 30-40% de los embriones llegan al estado de blastocistos (Urrego y Restrepo 2006).

La población de folículos es claramente forzada en la fase de crecimiento folicular por la administración de la hormona folículo estimulante (FSH). La administración de la hormona luteinizante crea condiciones óptimas *in vivo* para que los ovocitos adquieran la competencia y se logre una alta tasa de blastocistos, sin embargo, el folículo al no tener un ambiente ideal no tendrá un desarrollo competente (Urrego y Restrepo 2006). El estudio detallado de la calidad de los ovocitos y condiciones óptimas para la maduración *in vitro* es importante, es decir, las células del *cumulus oophorus* durante el crecimiento y la maduración de los ovocitos brindan nutrientes y moléculas mensajeras con el fin de desarrollar el ovocito (Gonzales y Gonzales 2005).

El desarrollo de los ovocitos después de la maduración puede verse afectado por una serie de factores como la osmolaridad, temperatura, pH, tensión de CO₂ y O₂, y uso de sueros y células somáticas (Sangild *et al.* 2000). Además, los laboratorios han complementado el medio de maduración con suero fetal bovino (SFB) y gonadotropinas en condiciones controladas. Después del tiempo de incubación de MIV, los ovocitos completan la maduración con la extrusión del primer corpúsculo polar (Bueno y Beltrán 2008). La temperatura es muy importante, ya que los ovocitos son extremadamente sensibles al choque térmico. Investigaciones han puesto de

manifiesto que la exposición de ovocitos a una temperatura de 25 °C durante 10 minutos puede causar severos cambios en su citoesqueleto e inducir la formación de “asters” corticales y otros trastornos ooplásmicos (Caicedo 2008).

Los medios de cultivo presentan generalmente sales inorgánicas (NaCl, KCl), fuentes energéticas (glucosa, piruvato y lactato de sodio), amortiguadores de pH (NaHCO₃) (Rodríguez 2012) y una fuente de proteína que generalmente es la albúmina sérica bovina (BSA) o suero fetal bovino (SFB) (Paramio e Izquierdo 2016). Los medios utilizados para el cultivo de los embriones presentan tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y co-cultivo con células somáticas; semi-definidos, se omite el co-cultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica; y definidos, el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona (Peláez 2011).

La cafeína en el medio de FIV estimula la hipermotilidad espermática, además posee un efecto sinérgico con la heparina, aumentando las tasas de penetración. La heparina se conoce como el Glicosaminoglicano (GAGs) más potente en su capacidad para inducir la reacción acrosomal. La cafeína también inhibe los nucleótidos fosfodiesterasa que son responsables de la degradación del Adenosin monofasto cíclico (AMPc), por lo tanto, el tratamiento con cafeína induce un aumento de AMPc intracelular, inhibiendo su descomposición enzimática (Niwa y Ohgoda 1988).

La suplementación con cafeína puede aumentar significativamente la polispermia (Fraser *et al.* 1995). En otras especies como el ratón se ha observado que la cafeína puede acelerar la tasa de capacitación mediante el aumento precoz de la concentración de AMPc (Fraser 1979). La heparina está presente en el aparato reproductor bovino induciendo la reacción acrosómica de los espermatozoides (Lee y Ax 1984). La heparina induce la reacción acrosómica aumentando la frecuencia de FIV dependiendo del periodo del tiempo que fueron expuestos (Parris *et al.* 1985).

Se ha demostrado que los espermatozoides congelados y descongelados tienen una gran diferencia en las tasas de penetración *in vitro* (Ohgoda *et al.* 1987). Además, el espermatozoide con cafeína en combinación con el ionóforo de calcio aumenta su capacidad de fertilización *in vitro* en comparación con el tratamiento de cafeína sola (Niwa y Ohgoda 1988). También se demostró que la cafeína tiene un aumento en la tasa de respiración y glucólisis (Garbers *et al.* 1971).

Con base a lo anterior se desarrolló esta investigación que tuvo como objetivos específicos:

- Determinar los porcentajes de maduración, fertilización, clivaje.
- Determinar el porcentaje de embriones al octavo día del cultivo *in vitro*.
- Determinar la eficiencia del proceso de FIV.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló entre julio de 2019 a agosto de 2020 en el laboratorio de Reproducción Animal, en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada a 32 kilómetros de Tegucigalpa, la capital de Honduras, con una temperatura promedio de 24 °C y una altura de 800 metros sobre el nivel del mar.

Los ovarios fueron obtenidos de vacas sacrificadas, los cuales fueron recolectados en la planta de sacrificio de la empresa EMPASA, localizada a cinco kilómetros de las instalaciones del laboratorio de Reproducción animal.

El día anterior al inicio de la maniobra, se realizó el proceso de esterilización de los equipos con alcohol clínico al 70% (cámara de flujo laminar, platinas térmicas, estereoscopios, pipetas Drummond). Cuatro horas antes de viajar a la planta de sacrificio, se dejó todo el equipo atemperando a 38 °C incluyendo el baño maría.

Recolección de ovarios

Se utilizó como medio de transporte la Solución Salina Fisiológica al 0.9% (SSF 0.9%) suplementada con antibióticos (estreptomina 0.5 g/L + penicilina G 100,000 UI/L) a 35 °C; los ovarios se colocaron en dicha solución hasta su transporte al laboratorio, tiempo que no superó las cuatro horas. Esta solución fue preparada dos horas antes de salir para la planta de sacrificio.

Una vez en el laboratorio se procedió a la etapa de acondicionamiento, la cual consistió en retirar los tejidos sobrantes como grasa, restos de trompas y cuernos uterinos. Posteriormente se lavaron tres veces en SSF 0.9% atemperada en baño maría a 35 °C. Los ovarios fueron distribuidos aleatoriamente en los dos tratamientos.

Aspiración de los ovocitos

Para la aspiración se utilizó agujas calibre 18 × 1½ pulgadas y jeringas de dos piezas estériles, el fluido folicular se depositó en un tubo que contenía Medio de Colección de Ovocitos (MCO) (Cuadro 1) y al terminar se esperó un tiempo de 15 minutos para permitir la decantación de los presuntos ovocitos. Solo se aspiraron folículos con diámetro entre 2-10 mm aproximadamente; una vez finalizada la aspiración de los folículos se dejó sedimentar por 10-15 minutos con el fin de que los complejos *cumulus* - ovocitos decantaran y formaran un pellet en el fondo del tubo.

Cuadro 1. Preparación del Medio de Colección de Ovocitos (MCO).

Descripción	Cantidad
Solución stock Minitube MCO 19990/0050 [®] MCO	10 mL
Suero Albúmina Bovino EFAF	60 mg

Atemperar a 38 °C por cuatro horas antes de realizar la maniobra.

Se prepararon dos placas de maduración (Petri 35 mm) con Medio de Maduración de Ovocitos (MMO) suplementado (Cuadro 2) preparando microgotas flotantes de 100 µL con anclaje de 10 µL cubriendo con aceite mineral y equilibrando 4 horas antes de realizar la maniobra, en la incubadora a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad relativa a saturación. Se depositaron 10 ovocitos por gota (proporción de un ovocito/10 µL de MMO).

El aceite mineral es un medio protector frente a cambios de pH y temperatura el cual protege a los ovocitos de contaminaciones. Sin embargo, otros autores consideran perjudicial su utilización porque afecta las tasas de desarrollo embrionario hasta blastocisto (Pedrero *et al.* 2003).

Una vez finalizada la aspiración de los folículos se dejó sedimentar por 10-15 minutos con el fin de que los complejos de *cumulus* - ovocitos decanten y formen un pellet en el fondo del tubo. Después de 15 minutos se eliminó el sobrenadante dejando solo 10 mL en el fondo a fin de evitar perder ovocitos, este volumen se vertió en una placa Grid para iniciar la búsqueda. El tubo fue lavado tres veces con MCO a medida que se van buscando los ovocitos.

Cuadro 2. Medio de Maduración de Ovocitos (MMO).

Descripción	Cantidad
Solución stock Minitube MMO 19990/0010 [®] MMO	9 mL
Suero de Vaca en Celo	1 mL
FSH stock (50 UI de FSH/10 mL de SSF estéril)	100 µL
LH stock (25 UI de LH/5 mL de SSF estéril)	50 µL

Esterilizar por filtración a 0.22 µm. Equilibrar a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Maduración *in vitro* (MIV)

Los ovocitos extraídos fueron clasificados y seleccionados con un mínimo de tres líneas de células de *cumulus oophorus* rodeando el ovocito, citoplasma homogéneo y zona pelúcida intacta; solo se utilizaron los ovocitos categoría 1.

Categoría 1: presenta tres capas compactas de célula de *cumulus* que lo rodean en toda su superficie, presentan citoplasma granulado y homogéneo por lo que llena completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida (Leibfried y First 1979).

Categoría 2: se presenta rodeado parcialmente por tres capas compactas de células de *cumulus*, presentan citoplasma granulado no homogéneo (periferia clara y centro oscuro), y lleno completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida (Leibfried y First 1979).

Los ovocitos seleccionados, luego de ser lavados tres veces en MCO y dos veces en MMO se transfirieron a las microgotas de MMO que se encontraban en la incubadora en grupos de 10 ovocitos/microgota y se colocaron a madurar por 24 horas a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación (95%).

Fertilización *in vitro* (FIV)

Todo el material se preparó tres horas antes de comenzar la fertilización. El Cuadro 3 presenta la preparación del medio de acondicionamiento y capacitación.

Cuadro 3. Medio de capacitación y acondicionamiento.

Descripción	Cantidad
Solución stock Minitube Medio de Capacitación 19990/0020®	20 mL
Suero Albúmina Bovino Fracción V	120 mg
Piruvato de sodio (solución stock: 11 mg/5 mL de DPBS)	200 µL
Gentamicina	1000 µL

Se esterilizó por filtración a 0.22 µm. Equilibrando a 38 °C, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) por 4 horas antes de realizar la maniobra.

Se dividió el volumen en dos tubos de policarbonato colocando 10 mL en cada uno y luego se llevó a equilibrar en la incubadora a 38.5 °C, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%); un tubo se marcó con la palabra “lavado”, el cual sirvió para realizar los lavados del semen luego de Percoll. Con el otro tubo de 10 mL se preparó el gradiente de Percoll 45-90% (Cuadros 4, 5 y 6).

Cuadro 4. Preparación del medio 10X SP-TL para Percoll 90%.

Descripción	Cantidad
Agua ultra pura	100 mL
NaCl	4.675 g
KCl	0.23 g
NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O	0.40 g
HEPES	2.38 g

Ajustar el pH a 7.3, esterilizar por filtración en 0.22 µm. Almacenar a 4 °C.

Cuadro 5. Preparación del Percoll 90%.

Descripción	Cantidad
Solución 10X SP-TL	4 mL
Bicarbonato de sodio	0.084 g
Lactato de Sodio	90 µL
Agitar suavemente hasta que el bicarbonato se disuelva completamente. Luego agregar:	
Percoll	36 mL
MgCl ₂	158 µL
CaCl ₂	78 µL
Se mezcló suavemente al ajustar pH a 7.3-7.45. Esterilizando por filtración en 0.45 µm. No debe formarse precipitado.	

Se colocó 3 mL de Percoll 90% en un tubo de 15 mL, y se equilibró cuatro horas antes de la maniobra de FIV, en la incubadora a 38.5 °C, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Cuadro 6. Preparación del Percoll 45%.

Descripción	Cantidad
Solución 10X-SP-TL	1.5 mL
Percoll 90%	1.5 mL
Se equilibró a la incubadora a 38.5 °C, 5% CO ₂ y humedad relativa a saturación (95%) por cuatro horas antes de la FIV.	

En los Cuadros 7 y 8 se presenta la preparación del medio de Fertilización *in vitro* (FIV) y de igual manera la preparación de la solución stock de cafeína.

Cuadro 7. Preparación del medio de Fertilización *in vitro* (FIV).

Descripción	Cantidad
Medio de Fertilización Minitube 19990/0030 [®]	10 mL
Suero Albúmina Bovino EFAF	60 mg
Piruvato de sodio	100 µL
Heparina	200 µL
Se esterilizó por filtración a 0.22 µm. Se equilibró en la incubadora a 38.5 °C, 5% CO ₂ y humedad relativa a saturación (95%) por cuatro horas antes de realizar la maniobra de fertilización.	

Se dividió en dos tubos de 5 mL y se marcó: FIV control y FIV cafeína. Se agregó 500 µL de cafeína (solución stock; Cuadro 8) al tubo marcado con FIV cafeína. Se prepararon dos placas nunc de fertilización (una placa con el FIV control y otra con el FIV cafeína): 600 µL/pozo (no se cubrió con aceite mineral).

Cuadro 8. Preparación de la solución stock de cafeína.

Descripción	Cantidad
Cafeína	0.3884 g
Agua ultrapura	20 mL

Se esterilizó por filtración a 0.22 μm ; se elaboraron alícuotas de 1.2 mL en tubos Eppendorf y se almacenó a -20 °C indefinidamente

Preparación del gradiente de Percoll 45-90%

Una hora antes de iniciar la maniobra de fertilización, en un tubo de 15 mL de policarbonato se depositó lentamente en el fondo del tubo del Percoll 45% los 3 mL del Percoll al 90%. Debe formarse un menisco entre los dos gradientes. El Percoll al 90% en el fondo y el 45% sobre este (sotoposición), después devolverlo a la incubadora.

Cumplidas las 24 horas de maduración, se retiró las placas de maduración de cada tratamiento, transfiriendo los ovocitos a una placa Petri X atemperada realizando dos lavados con medio de fertilización, luego se pasó a las placas nunc de FIV, depositando aproximadamente la mitad de los ovocitos en la placa FIV control y la otra mitad en la FIV cafeína y se colocaron nuevamente en la incubadora a 5% CO₂, 38.5 °C y humedad relativa a saturación.

Descongelación del semen

Se descongeló en agua a 35 °C durante 45 segundos dos pajuelas de semen del mismo toro. Las pajuelas se secaron con papel toalla; la pistola y las tijeras se desinfectaron previamente con alcohol clínico al 70% el día anterior. Se armó la pistola de inseminación y se depositó el semen suavemente sobre las paredes del tubo que contienen los gradientes de Percoll 45-90%. Se realizó la centrifugación a 700 g durante 10 minutos.

Después de centrifugar por 10 minutos, se extrajo el pellet del fondo con pipeta Pasteur y se depositó en el tubo de lavado. Se centrifugó de nuevo a 200 g/10 minutos y se eliminó el sobrenadante dejando 0.5 mL en el fondo del pellet. Se realizó el cálculo de la concentración utilizando la cámara de Neubauer. Para efectos prácticos se tomó 600 μL que corresponden al volumen de cada pozo de la placa nunc de fertilización lo cual se dividió por el número de espermatozoides contados, el resultado obtenido significa el volumen en μL que debe tomarse del tubo que contiene los espermias a fin de fertilizar con 1×10^6 espermias/mL. Se depositó el volumen calculado de espermias en cada pozo de las placas FIV y se llevó nuevamente a la incubadora a 5% CO₂, 38.5 °C y humedad relativa a saturación durante 18 horas.

Cultivo *in vitro* (CIV)

Se preparó el medio de cultivo fluido sintético de oviducto (SOF) con un mínimo de 4 horas antes de iniciar la maniobra (Cuadro 9), en placas nunc colocado microgotas de 100 μL de SOF y cubriendo con aceite mineral.

Cuadro 9. Preparación del medio de Fluido Sintético de Oviducto (SOF).

Descripción	Cantidad
Medio de Cultivo SOF Minitube 19990/0041 [®]	10 mL
Suero de Vaca en Celo	1 mL
Aminoácidos esenciales	400 µL
Aminoácidos no esenciales	100 µL
Gentamicina	60 µL

Se esterilizó por filtración a 0.22 µm. Se equilibró en la incubadora a 38.5 °C, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) por cuatro horas antes de realizar la maniobra de cultivo.

Posterior a las 18 horas de fertilización, se colocaron los presuntos ovocitos fertilizados en tubo Eppendorf de 1.5 mL con 900 µL de SOF+100 µL de Hialuronidasa atemperada a 38.5 °C, se dejó decantar durante 5 minutos y se retiró entre 600-700 µL del sobrenadante, se llevó al vortex por 3 minutos. Posteriormente se vació el contenido en una placa Petri con gotas de 800 µL de SOF en cada pozo, se lavó el tubo Eppendorf tres veces con medio SOF y se inició la clasificación y selección de los presuntos ovocitos fertilizados, se lavó tres veces en SOF llevándolos a las placas de cultivo conservando la proporción de 10 ovocitos/microgota y luego se llevó las placas a la incubadora a 5% CO₂, 38.5 °C y humedad relativa a saturación.

Evaluación de los cultivos:

- El día 3 del cultivo se suplementó con el 10% del suero fetal bovino (10 µL por gota) y se evaluó la tasa de clivaje.
- El día 8 se evaluaron las tasas de producción de mórulas y blastocistos, la cual se calculó por medio de la ecuación 1:

$$\frac{\text{\# embriones segmentados}}{\text{\# embriones colocados inicialmente}} \times 100 \quad [1]$$

Tratamientos

Se aplicaron dos tratamientos:

FIV + cafeína: Medio de Fertilización suplementado con 500 µL de Cafeína (3.88 mg/mL).

FIV control: Medio de Fertilización sin suplementar (control).

Se analizaron las siguientes variables:

- Porcentaje de maduración *in vitro*
- Porcentaje de fertilización *in vitro*
- Porcentaje de clivaje (división celular)
- Porcentaje de apoptosis (muerte celular)
- Porcentaje de embriones obtenidos (mórulas-blastocistos)

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (FIV + Cafeína y FIV control) y dos repeticiones por tratamiento para un total de 377 y 337 ovocitos para FIV + Cafeína y FIV control respectivamente. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) con la ayuda del programa estadístico “Statistical Analysis Systems” (SAS[®] 2012), con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recolección de ovocitos

Los ovocitos fueron extraídos de ovarios de vacas *post mortem* utilizando la técnica de aspiración folicular; se logró extraer 714 ovocitos totales, de los cuales se usaron 337 para el tratamiento FIV control con 79.2% de ovocitos viables dejando 20.8% de ovocitos degenerados, dando un promedio de 2.70 ovocitos por ovario, sin embargo en el tratamiento FIV + cafeína se extrajo 377 ovocitos, siendo el 80.4% ovocitos viables y el 19.6% de ovocitos degenerados dando un promedio de 2.94 por ovario (Cuadro 10; Figura 1).

La condición corporal y la nutrición de la hembra se ve reflejada en la cantidad de ovocitos viables (Palma 2008). Un factor importante que se debe tomar en cuenta dentro de este proceso es la experiencia del operario, que influye en el número de folículos aspirados, de ovocitos recuperados y del desarrollo posterior de embriones (Caicedo 2008). Por otra parte, el estado fisiológico y la condición corporal de las hembras donantes (hembras en producción y/o hembras de descarte) es un factor que puede afectar las cantidades de estructuras aspiradas (Palma 2008).

Cuadro 10. Número de ovarios procesados (NOP), ovocitos aspirados (OA), ovocitos viables (OV) y ovocitos degenerados (OD) de hembras bovinas para los tratamientos con cafeína y control.

Tratamiento	NOP	OA	OV	OD	OA /NOP	OV /NOP	OD /NOP
Cafeína	103	377	303	74	3.66	2.94	0.72
Control	99	337	267	70	3.40	2.70	0.71
Promedio total	202	714	570	144	3.53	2.82	0.71

OA/NOP: relación ovocitos aspirados/número de ovocitos procesados; OV/NOP: relación ovocitos viables/número de ovocitos procesados; OD/NOP: relación ovocitos degenerados/número de ovocitos procesados.

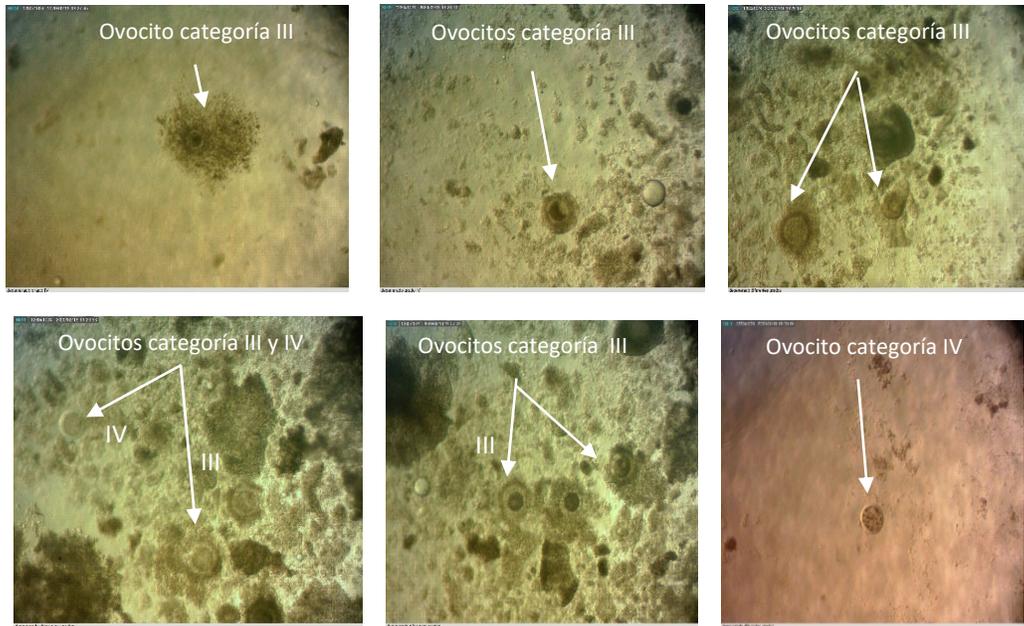


Figura 1. Ovocitos degenerados.

En el acondicionamiento los ovocitos se clasificaron de acuerdo con cuatro categorías: Categoría I: ovocitos con más de tres capas de células de *cumulus* compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granulado. Categoría II: ovocitos con menos de tres capas de células de *cumulus* y citoplasma generalmente homogéneo. Categoría III: ovocitos con una sola capa de células de *cumulus* y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras y Categoría IV: ovocitos desnudos (Figura 2) (Peláez 2011).

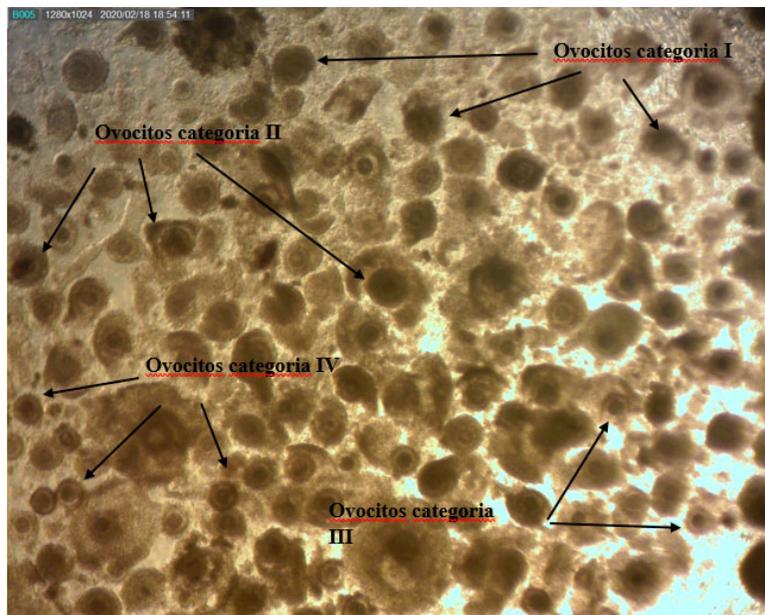


Figura 2. Ovocitos recolectados. Ovocitos clasificados según su morfología en categorías I, II, III y IV.

Porcentaje de Maduración *in vitro* (MIV)

Las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 11). Estos resultados demuestran que el medio de maduración utilizado dio resultados similares en los ovocitos de ambos tratamientos (Figura 3).

Los ovocitos maduros poseen una capa de células granulosas con un citoplasma homogéneo, así como un corpúsculo polar recientemente extruido (Martínez 2013). La maduración de los ovocitos implica no sólo la adquisición de competencia meiótica, sino también la maduración citoplasmática junto a las células del *cumulus oophorus* que lo rodean, las cuales llevan a cabo funciones nutritivas y reguladoras (Ahuja Aguirre *et al.* 2009).

Cuadro 11. Porcentajes de ovocitos viables y madurados para los tratamientos con cafeína y control.

Tratamiento	Ovocitos viables (%)	Ovocitos madurados (%)
Cafeína	80.37	87.13
Control	79.23	85.02
CV	8.93	10.65
Probabilidad	0.70	0.46

CV: Coeficiente de variabilidad.

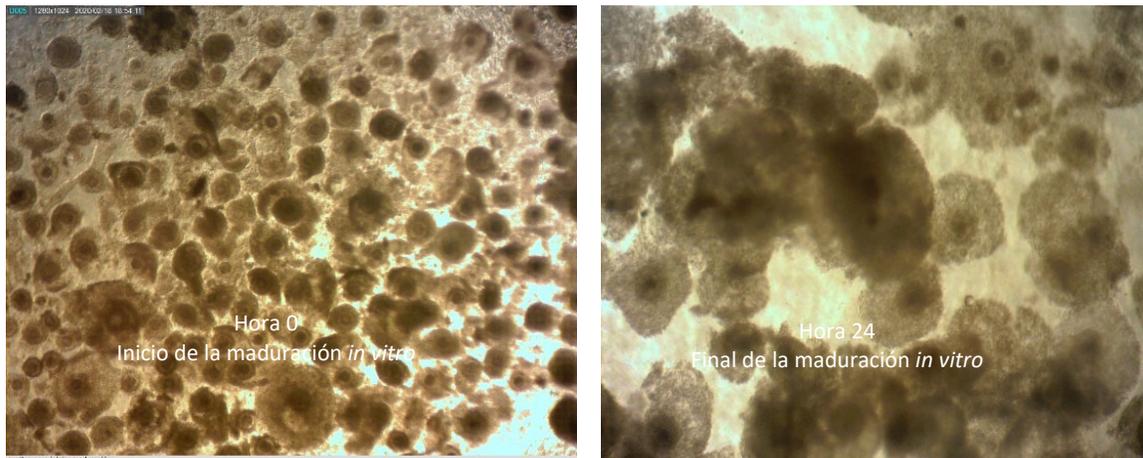


Figura 3. Ovocitos antes y después de la maduración *in vitro* por 24 horas. Izquierda: inicio de la maduración *in vitro* (hora 0); Derecha: final de la maduración *in vitro* (hora 24).

Porcentaje de Fertilización *in vitro* (FIV)

Los ovocitos fertilizados fueron aquellos en los cuales el espermatozoide logró traspasar la zona pelúcida del ovocito, dando como resultado la formación de una célula llamada cigoto (Figura 4) y la liberación del segundo corpúsculo polar. Las diferencias encontradas no fueron significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 12), obteniendo valores porcentuales para ambos tratamientos en un rango entre 75 y 82% de fertilización, lo cual sugiere que, bajo las condiciones de este estudio, la adición de cafeína al medio de fertilización *in vitro* no mejora este parámetro.

Estos resultados son similares a los reportados por Brackett y Zuelke (1993) quienes realizaron un estudio de fertilización *in vitro* usando el antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario. El medio utilizado fue TCM-199 el cual se suplementó con SFB y SVC, de igual manera se utilizó el lavado del semen por centrifugación y se combinó heparina y cafeína para su capacitación, obteniendo un promedio de 82.77% de ovocitos fecundados mientras que en la formación de pronúcleos masculinos y femeninos se observó un promedio de 83.22%. Por lo tanto, estos resultados son similares a los valores sugeridos por Urrego y Restrepo (2006) quienes concluyen que en los procesos de FIV aproximadamente el 70-80% de los ovocitos son fertilizados y se dividen hasta el estado de dos células.

Otro estudio realizado por Ferreira *et al.* (2008) sobre la evaluación del efecto de promotores de maduración oocitaria *in vitro* en bovinos, evidenciaron que existe una diferencia significativa entre los diferentes sueros durante el proceso de fertilización. El mayor porcentaje fertilización de ovocitos se obtuvo con el Suero de Yegua en Estro (89.9%), seguido por el Suero del Neonato Precalostral (82.4%), el Suero de Vaca en Estro (75.9%) y el Suero Fetal bovino que presentó el menor porcentaje (74.1%); los resultados por estos autores son similares a los obtenidos en el presente estudio tanto para el medio suplementado con cafeína como para el control.

Por otro lado, con respecto al porcentaje total de embriones, en un estudio realizado por Cesari *et al.* (2006) sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos menciona que durante la técnica de acondicionamiento con Percoll el porcentaje de embriones luego de la Fecundación *in vitro* tuvo un promedio de 38.7% mientras que con la técnica de “Swim-up” se obtuvo 31.3%, sin embargo, se afirma que solo el 25 a 40% de los embriones alcanzan el estado de blastocisto. De igual forma Hendriksen *et al.* (2000) concluyen que en la mayoría de los protocolos de producción de embriones *in vitro* solo entre un 15 y 50% de los ovocitos alcanza la etapa de blastocisto. Por lo tanto, se puede concluir que resultados de esta investigación son superiores a los reportados por estos autores tanto para el tratamiento control y cafeína.

Cuadro 12. Porcentaje de ovocitos fertilizados, en clivaje y apoptosis al tercer y sexto día y embriones para los tratamientos con cafeína y control.

Tratamiento	Ovocitos Fertilizados (%)	Ovocitos Clivaje (%)	Ovocitos Apoptosis al 3 día (%)	Cigotos en apoptosis del 4 al 6 día (%)	Embriones (%)
Cafeína	81.06	75.23	24.77	29.81	52.80
Control	78.85	73.74	26.26	31.06	50.84
CV	12.59	13.99	8.48	11.12	15.25
Probabilidad	0.54	0.73	0.73	0.81	0.69

CV: Coeficiente de variabilidad.

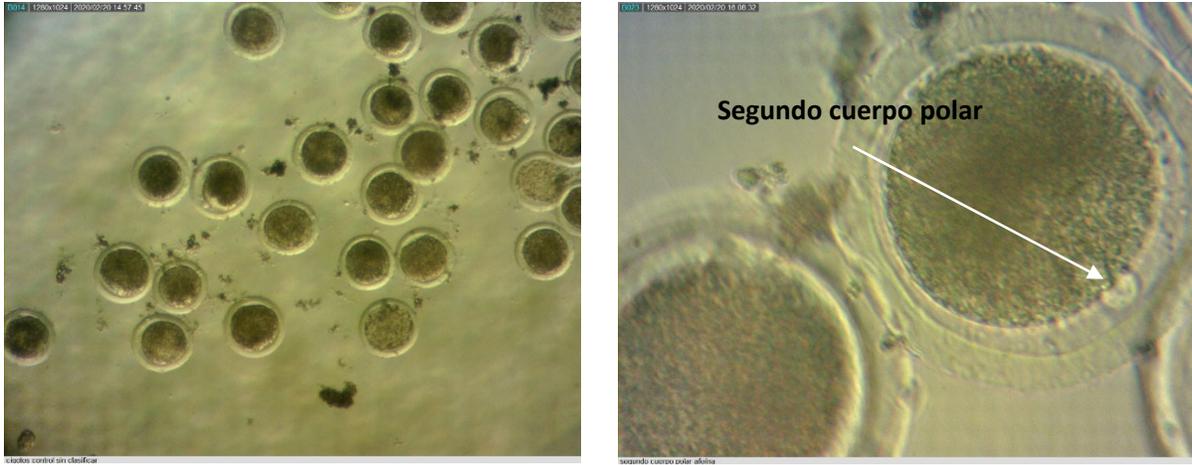


Figura 3. Izquierda: grupos de presuntos cigotos sin clasificar, luego de 18 horas de fertilización *in vitro*. Derecha: ovocito fecundado. Nótese la extrusión del segundo cuerpo polar.

Porcentaje de apoptosis y clivaje

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular asociado a ciertos cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que requieren una regulación coordinada de genes específicos. Su función principal es mantener los tejidos y órganos de una muerte celular controlada para así lograr un adecuado balance entre la muerte y la proliferación celular (Zamora *et al.* 2005).

Las diferencias encontradas no fueron significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 12), obteniendo valores porcentuales para ambos tratamientos en un rango de 73 y 76% de ovocitos en clivaje (Figura 5 y 6). Caicedo y Toro (2016) al usar el protocolo SOF obtuvieron un porcentaje de clivaje de 22.22% y apoptosis de 77.78%, mientras que con el protocolo Albúmina Lactato Piruvato (TALP) se obtuvo un porcentaje de clivaje y apoptosis de 47.62% y 52.38% respectivamente, resultados muy inferiores a los obtenidos en esta investigación tomando en cuenta que el medio de cultivo utilizado en la presente investigación fue igualmente Fluido Sintético del Oviducto (SOF).

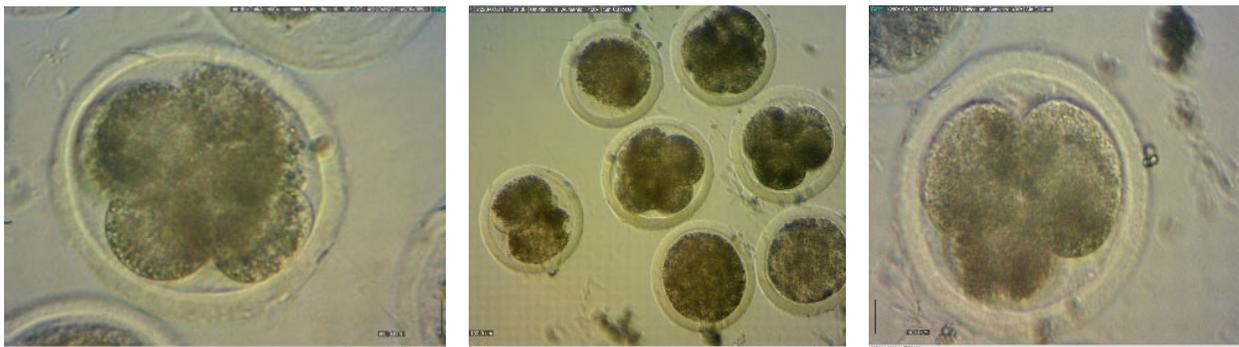


Figura 4. Clivaje a las 72 horas en el tratamiento con cafeína.

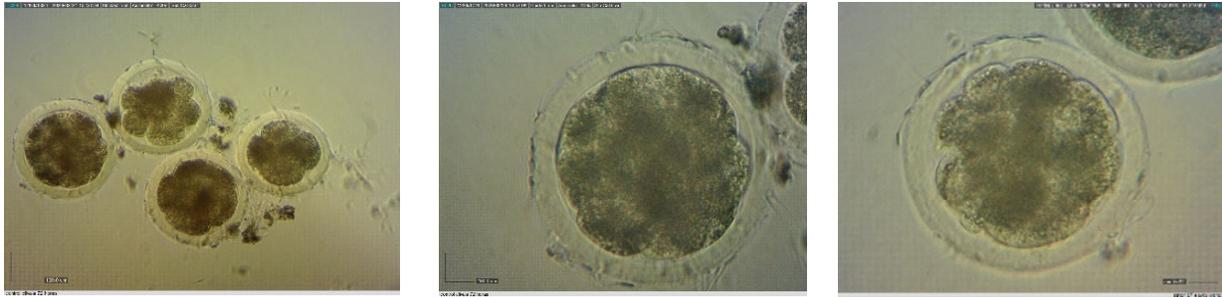


Figura 5. Clivaje a las 72 horas en el tratamiento control.

Porcentaje de mórulas y blastocistos

Las diferencias encontradas no fueron significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 13), obteniendo valores porcentuales para el total de mórulas y el total de embriones obtenidos de 27.01% y 29.67% para el tratamiento cafeína y control respectivamente.

Estos resultados superan los reportados por Rodríguez (2012) quien utilizando medios permanentes obtuvo 13 y 27% de mórulas grado I y II respectivamente, sin embargo, al compararlos con este mismo autor, utilizando medios secuenciales, son inferiores, ya que lograron 31 y 47% para mórulas grado I y II respectivamente.

Otro estudio realizado por Hernández (2019) obtuvo que en el tratamiento Polivinipirrolidona (PVP) presentó en mórulas grado I 11.11% y en mórulas grado II 7.41%, mientras que en SFB obtuvo un 0% en mórulas grado I y un 67.74% en mórulas grado II, mientras que en el tratamiento control (sin ninguna suplementación) no se obtuvo ningún embrión. Estos resultados difieren a los obtenidos en esta investigación.

Con respecto a los blastocistos, tampoco hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 13; Figuras 7 y 8). Del total de embriones obtenidos para FIV + cafeína (113 embriones) y FIV control (91 embriones), el 76.99% y 81.31% fueron blastocistos respectivamente. Estos resultados difieren a los de Hernández (2019) quien al utilizar el tratamiento PVP obtuvo 75.93% en blastocistos grado I y 5.56% en blastocistos grado II, mientras que al usar el tratamiento SFB obtuvo un 32.26% en blastocistos grado I y un 0% en blastocistos grado II.

Según Urrego y Restrepo (2006) al realizar un proceso de MIV el 90% de ovocitos inmaduros llegan a metafase y aproximadamente el 70% a 80% quedan fertilizados. Sin embargo, se estima que alrededor del 30% a 40% de los embriones llegan a estado de blastocisto. Con estos resultados se puede determinar que los porcentajes o valores obtenidos en esta investigación son superiores a los valores sugeridos por estos autores.

Cuadro 13. Estadío y grado de los embriones obtenidos para los tratamientos con cafeína y control.

Tratamiento	Mórulas grado I (%)	Mórulas grado II (%)	Blastocistos grado I (%)	Blastocistos grado II (%)
Cafeína	15.04	7.96	42.48	34.51
Control	18.68	10.99	39.56	30.77
CV	6.14	7.44	20.20	23.21
Probabilidad	0.48	0.46	0.67	0.57

CV: Coeficiente de Variabilidad.



Figura 6. Blastocistos en diferentes estadíos: protruyendo (Bp), protruidos y expandidos (Be) en el tratamiento con cafeína.



Figura 7. Blastocistos en diferentes estadíos: protruyendo (Bp), protruidos y expandidos (Be) en el tratamiento control.

Eficiencia general

Las diferencias encontradas no fueron significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos para la eficiencia en cada una de las etapas del proceso de FIV (Cuadro 14). En este estudio se consideró relevante evaluar la eficiencia del procedimiento con respecto a la cafeína en el medio FIV, con base a la cantidad de embriones/ovocitos viables obtenidos al inicio de cada experimento. Por lo que se determinó que los resultados obtenidos en cada procedimiento independientemente de los tratamientos realizados pueden variar de acuerdo con los diversos componentes en cada medio del proceso de FIV. Además, cada investigación realizada permite comparar diferentes tratamientos y estimar cual es viable de acuerdo con lo que se quiere estudiar. De igual manera los valores obtenidos son similares a los establecidos por Urrego y Restrepo (2006) quienes concluyen que

sólo alrededor del 30-40% de los embriones llegan al estado de blastocistos tomando como punto de partida los ovocitos viables.

Cuadro 14. Eficiencia del procedimiento de FIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje.

Tratamiento	Embriones/ ovocitos viables (%)	Embriones/ ovocitos madurados (%)	Embriones/ ovocitos fertilizados (%)	Embriones/ ovocitos en clivaje (%)
Cafeína	113:303 (37.29)	113:264 (42.80)	113:214 (52.80)	113:161 (70.19)
Control	91:267 (34.08)	91:227 (40.09)	91:179 (50.84)	91:132 (68.94)
CV	6.36	4.62	2.67	1.27
Probabilidad	0.42	0.54	0.69	0.81

CV: Coeficiente de variabilidad.

4. CONCLUSIONES

- Los porcentajes de maduración *in vitro* fueron similares para los tratamientos FIV + cafeína y FIV control.
- Bajo las condiciones de este estudio, la adición de cafeína al medio de fertilización *in vitro* no mejora los porcentajes de fertilización, clivaje y embriones obtenidos al día 8 de cultivo.
- La eficiencia general del procedimiento FIV fue similar para los tratamientos FIV + cafeína y FIV control.

5. RECOMENDACIONES

- Desarrollar investigaciones evaluando diferentes concentraciones y volúmenes de cafeína en el medio FIV.
- Evaluar la suplementación de cafeína utilizando diferentes protocolos de fertilización *in vitro*.
- Evaluar la suplementación de cafeína en el medio de fertilización *in vitro* utilizando ovocitos provenientes de ovarios de matadero vs ovocitos obtenidos por aspiración de ovocitos *in vivo* (OPU).

6. LITERATURA CITADA

- Ahuja Aguirre C, Montiel F, Pérez P, Gallegos J. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*, 27(3): 277-284.
- Bueno A, Beltrán M. 2008. Produção *in vitro* de embriões bovinos. *Revista Científica Electrónica de Medicina Veterinária*, 6(11): 1679-7353.
- Brackett B, Zuelke K. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39(1): 43-64.
- Caicedo J. 2008. Aplicaciones de la aspiración folicular – fertilización *in vitro* en bovinos y factores que pueden afectar su eficiencia [Tesis]. Universidad de La Salle, Bogotá- Colombia. 24 p.
- Caicedo M, Toro M. 2016. Comparación de los protocolos SOF y TALP de fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana el Zamorano. 22 p.
- Cesari A, Kaiser G, Mucci N, Mutto A, Vicente A, Fornés M, Alberio R. 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, 66(5): 1185-1193. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.029
- Crespo J, Guamán E. 2015. Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de gene diffusion [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana el Zamorano. 17 p.
- [FAO], Food and Agriculture Organization. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación; [consultado el 17 de may. de 2020]. <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s00.htm>
- Ferreira P, Vásquez M, Díaz C, Dalmau E. 2008. Evaluación del efecto de promotores de maduración oocitaria *in vitro* en bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(16): 9-26.
- Filipiak Y, Larocca C. 2010. Manual de fertilización *in vitro* en bovinos. Uruguay: Universidad de la República; [consultado el 21 de mar. de 2020]; https://www.researchgate.net/publication/230801504_Manual_de_Fertilizacion_In_Vitro_en_Bovinos#fullTextFileContent
- Fraser R. 1979. Accelerated mouse sperm penetration *in vitro* in the presence of caffeine. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57(2): 377-384. doi: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0570377>

- Fraser L, Abeydeera L, Niwa K. 1995. Ca_2^+ regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 40(2): 233-241. doi: 10.1002/mrd.1080400213.
- Garbers L, Firts L, Sullivan J, Lardy A. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biology of Reproduction*, 5(3): 336-339. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/5.3.336>
- Gordon J, Gadea J. 2003. Efecto del medio de fecundación *in vitro* sobre el patrón de reacción acrosómica en el espermatozoide bovino. *Anales de Veterinaria Murcia*, 19: 15-22.
- Gonzales H, Gonzales H. 2005. Maturation of pig oocytes *in vitro* in a medium with pyruvate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(6): 869-872. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000600008>
- Hernández M. 2019. Efecto del uso de dos macromoléculas en el medio de maduración de oocitos sobre la tasa de producción de embriones *in vitro* en bovinos [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana el Zamorano. 11 p.
- Hendriksen P, Vos P, Steenweg W, Bevers M, Dieleman S. 2000. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology*, 53:11-20. doi: 10.1016/s0093-691x(99)00236-8
- Lee N, Ax L. 1984. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. *Department of Dairy Science*, 67(9): 2006-2009. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(84)81536-2
- Leibfried L, First N. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 48(1):76-86. <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>
- Martínez Y. 2013. Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación *in vitro* [Tesis]. Asturias- España: Universidad de Oviedo. 19 p.
- Niwa K, Ohgoda O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30(4): 733-741. doi: 10.1016/0093-691x(88)90308-1
- Ohgoda O, Niwa K, Yuhara M, Takahashi S, Kanoya K. 1987. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology*, 29(6): 1375-1381. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90018-0)
- Palma G. 2008. *Biología de la Reproducción*. 2ª ed. Mar de Plata (Argentina): Reprobiootec. 669p. ISBN: 978-987-05-3271-2.

- Paramio M, Izquierdo D. 2016. Recent advances *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86(1): 152-159. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.027
- Parris J, Susko-Parrish JL, First N. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*, 24(5): 537-549. doi: 10.1016/0093-691x(85)90060-3
- Pedrero S, Gutiérrez L, Guarnizo M, Bachiller J, Estrade A, Gasca L, Salido E, Bebek H. 2003. Cultivo embrionario en microgotas recubiertas por aceite mineral. Comparación de resultados de dos tipos de aceites. *Iberoamericana de Fertilidad*, 20(2): 103-107.
- Peláez V. 2011. Producción *in vitro* de embriones bovinos [Monografía]. Cuenca- Ecuador: Universidad de Cuenca. 19 p.
- Rodríguez J. 2012. Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial [Tesis]. Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana. 8 p.
- Sangild P, Schmidt M, Jacobsen H, Fowden A, Forhead A, Avery B, Greve T. 2000. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro*-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 62(6): 1495-1504. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1495>
- Urrego R, Restrepo G. 2006. Implicaciones de la biotecnología reproductiva en la producción animal. *Revista Medicina Veterinaria*, 2(2):74-78.
- Urribarrí Y, Hernández J, Villamediana P, Mosquera J, Pirela A, Peláez J, Hernández H. 2012. Estudio ultraestructural de embriones bovinos producidos *in vitro* durante las etapas de desarrollo temprano y tardío. *Revista Científica FCV- LUZ*, XXII(3): 201-210.
- Zamora J, Otárola I, Brenes O. 2005. La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Revista Chilena de Nutrición*, 32(3): 178-190.

7. ANEXOS

Anexo 1. Recolección de ovarios.



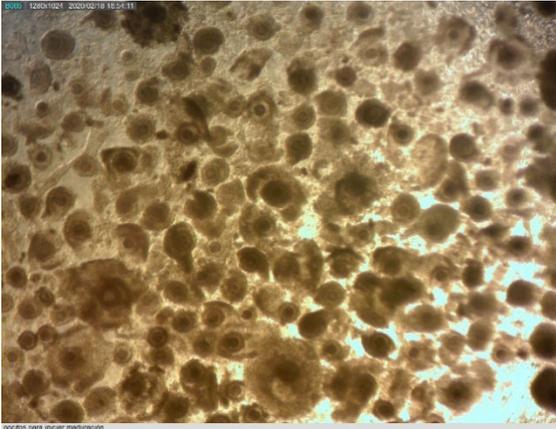
Anexo 2. Acondicionamiento de ovarios.



Anexo 3. Aspiración folicular.



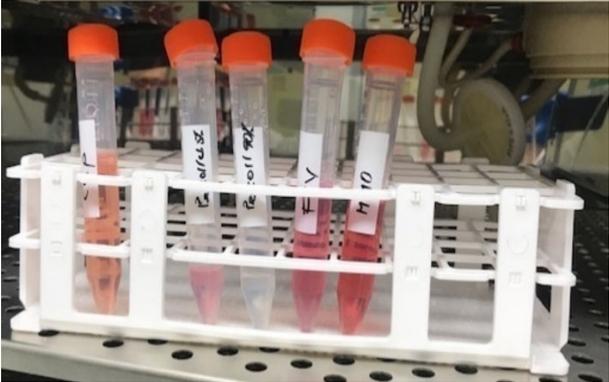
Anexo 4. Búsqueda de ovocitos viables.



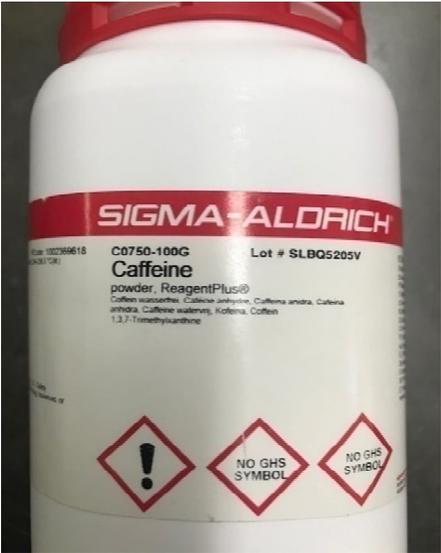
Anexo 5. Instrumentos utilizados.



Anexo 6. Medios de cultivo FIV.



Anexo 7. Tratamiento Cafeína.



Anexo 8. Microgotas flotantes para maduración *in vitro*.

