

**Fertilización *in vitro* en bovinos en el  
Laboratorio de Reproducción Animal de  
Zamorano utilizando el protocolo de Genes  
Diffusion**

**Johanna Lizeth Crespo Calva  
Eloisa Gloria Guamán Gutiérrez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Fertilización *in vitro* en bovinos en el  
Laboratorio de Reproducción Animal de  
Zamorano utilizando el protocolo de Genes  
Diffusion**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingenieras Agrónomas en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Johanna Lizeth Crespo Calva  
Eloisa Gloria Guamán Gutiérrez**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2015

# **Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion**

Presentado por:

Johanna Lizeth Crespo Calva  
Eloisa Gloria Guamán Gutiérrez

Aprobado:

---

John Jairo Hincapié, Ph.D.  
Asesor Principal

---

John Jairo Hincapié, Ph.D.  
Director Departamento de Ciencia y  
Producción Agropecuaria

---

Isidro Matamoros, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl Zelaya, Ph.D.  
Decano Académico

---

Rogel Castillo, M.Sc.  
Asesor

## **Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion.**

**Johanna Lizeth Crespo Calva  
Eloisa Gloria Guamán Gutiérrez**

**Resumen:** La producción de embriones *in vitro* en bovinos mejora la eficiencia productiva, incrementando el número de animales que pueden criarse a partir de vacas de alto valor genético. Para obtener embriones viables, es necesario un protocolo que brinde las pautas necesarias de producción *in vitro* con el uso de medios de cultivo, tiempo y condiciones ambientales que simulen el escenario real de la producción natural de embriones en la madre y así lograr resultados eficientes; el objetivo principal del estudio fue desarrollar el proceso de fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano, utilizando el protocolo propuesto por el laboratorio francés Genes Diffusion. Para el desarrollo de este estudio se aspiraron 36 ovarios de matadero de los cuales se extrajeron, por el método de aspiración folicular, 241 oocitos, de estos 90(37.34%) se clasificaron como degenerados y 151(62.66%) fueron viables, resultando un promedio de 4.03 oocitos viables por ovario; los 151 oocitos fueron sometidos al medio de maduración TCM199 + P/S, posteriormente fueron incubados a 2 gases (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) a 38.5°C durante 24 horas, como resultado 11 (74.17%) presentaron expansión de las células del *cumulus oophorus* y 39(25.83%) no maduraron; el total de oocitos madurados fueron fertilizados utilizando el medio Heparina porcina+PHE e incubados a 2 gases durante 18 horas, obteniendo 88(78.57%) oocitos fertilizados y 24(21.43%) no fertilizados; los 88 oocitos fertilizados fueron cultivados en el medio SOF obteniendo 53(60.20%) oocitos con división celular (clivaje) y 35(39.80%) oocitos con muerte celular (apoptosis), obteniendo 30(56.60%) blastocistos al séptimo día.

**Palabras claves:** Apoptosis, blastocistos, *cumulus oophorus*, clivaje, oocitos.

**Abstract:** *In vitro* embryo productions in cattle increases the number of animals that can be bred from cows of high genetic value. In order to obtain viable embryos, we need a protocol that provides the necessary guidelines for *in vitro* production with the use of culture media, time and environmental conditions that simulate the real scenario of the natural production of embryos in the mother and achieve efficient results. The main objective of the study was to develop the process of *in vitro* fertilization in cattle in the Laboratory of Animal Reproduction Zamorano, using the method proposed by the protocol of French laboratory Genes Diffusion. For development 36 ovarian slaughter from which 241 oocytes were extracted by the oocyte method; of these 90 (37.34%) were classified as degenerate and 151 (62.66%) were viably aspirated, resulting in a 4.03 average viable oocytes per ovary. 151 oocytes were subjected to maturation medium TCM199 + P / S, then were incubated with 2 gases (38.5 ° C, 5% CO<sub>2</sub>) for 24 hours. This resulted in 112 oocytes (74.17%) that showed expansion of cells *cumulus oophorous* and 39 (25.83%) that did not ripen. The total matured oocytes were fertilized using porcine heparin + PHE medium and incubated 2 gases for 18 hours to obtain 88 (78.57%)

fertilized oocytes and 24 (21.43%) unfertilized; 88 fertilized oocytes were cultured in SOF medium obtained 53 (60.20%) oocytes with cell division (cleavage) and 35 (39.80%) oocytes with cell death (apoptosis) to obtain 30 (56.60%) blastocysts the seventh day.

**Keywords:** Apoptosis, blastocysts, *cumulus oophorous*, cleavage, oocitos.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen.....	iii
Contenido .....	v
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>21</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>22</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>25</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Solución Stock Heparina .....	6
2. Medio de base T .....	6
3. Medio Ferti sin BSA .....	6
4. Medio de Fecundación .....	7
5. Stock A.....	8
6. Stock B.....	8
7. Stock C.....	8
8. Stock D.....	8
9. Medio SOF.....	9
10. Medio de Cultivo .....	9
11. Número de oocitos recuperados utilizando la técnica de punción ovárica .....	14
12. Porcentaje de Maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	16
13. Porcentaje de Fertilización <i>in vitro</i> .....	17
14. Porcentaje de clivaje y apoptosis .....	18
15. Porcentaje de Blastocistos obtenidos al día 7 .....	19

Figuras	Página
1. Oocitos obtenidos mediante punción ovárica con sus estructuras. A) Oocito viable B) Oocito degenerado .....	15
2. Oocito obtenido de maduración <i>in vitro</i> . A) Partes de un oocito madurado B) Oocito madurado y no madurado.....	16
3. Oocitos fertilizados en el día cero del proceso de fertilización <i>in vitro</i> .....	17
4. Embriones en clivaje en el Laboratorio de Reproducción Animal de la EAP Zamorano. A) Estados embrionarios. B) Selección de blastocistos con la pipeta Drummond .....	18
5. Embriones en apoptosis .....	18
6. Blastocistos al día 7.....	19

Anexos	Página
1. Etapas del desarrollo embrionario hasta Blastocistos.....	25
2. Oocitos aspirados.....	25
3. Oocitos 18 horas poscultivo con espermatozoides.....	26
4. Oocitos día 1 de cultivo.....	26
5. Embriones al día 3.....	27

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector pecuario representa el 40% de la producción agrícola mundial, es una de las secciones de mayor crecimiento en la economía agrícola. En varios países la producción pecuaria se ha convertido en una actividad de diferentes enfoques, la cual cubre necesidades de mejora en la seguridad de productos que la sociedad demanda, éste se ha desarrollado conjuntamente con el medio ambiente para mantener su base de sostenibilidad (FAO 2012).

La producción pecuaria es importante para el crecimiento económico de los países en desarrollo y la aplicación de la biotecnología es dada en gran medida por consideraciones comerciales y objetivos socioeconómicos, con el fin de aumentar productividad (Madan 2005).

Existe un amplio número de biotecnologías que se usan en cada uno de los tres sectores principales de la zootecnia que se ubican como: reproducción que cubre genética y mejoramiento; nutrición y la producción que cubre sanidad animal y bienestar animal (FAO 2010).

La biotecnología de la reproducción comprende técnicas como: inseminación artificial y preservación de semen, usadas para el mejoramiento genético del ganado; sexado de espermatozoides, superovulación, transferencia de embriones, producción de embriones *in vitro* y clonación, usadas para mejorar la eficiencia reproductiva y la tasa de reproducción (Madan 2005).

La fertilización *in vitro* (FIV) se ha realizado con varias especies de animales domésticos, esta técnica se ha desarrollado a lo largo de varios años por lo cual cada vez ha ido mejorando; el primer ternero nacido mediante esta técnica fue en el año de 1981 (Reyes 1995).

La técnica de FIV está basada en la maduración artificial de huevos no fecundados (oocitos) que generalmente provienen de los ovarios de vacas sacrificadas en mataderos, los que posteriormente son fecundados con espermatozoides criopreservados (congelados-descongelados), previamente capacitados; los cigotos resultantes se incuban en el laboratorio hasta la etapa de blastocisto. La técnica de FIV permite obtener muchos embriones sincronizados a una etapa específica de desarrollo (Reyes 1995).

Los embriones resultantes de ésta técnica, pueden trabajar en conjunto con otras biotecnologías como la transferencia de los núcleos, clonación o la inyección del material genético a otras células para la producción de embriones transgénicos, lo que puede representar un gran impacto en las estrategias de reproducción (Reyes 1995)

La FIV a gran nivel representa el primer paso hacia nuevas biotecnologías. Los embriones producidos pueden ser mantenidos en frío (criopreservación) y luego transferirse a vacas receptoras sincronizadas hormonalmente, igual que en la transferencia de embriones tradicional; también, los embriones pueden ser sometidos a procedimientos como micromanipulación de las células embrionarias en etapa temprana (blastómeros), clonarse o someterse a efectos de ingeniería genética (Reyes 1995).

La FIV presenta destacables ventajas:

- Hace posible mantener la primera generación, facilita el manejo de corssbreeding cuando se trabaja con más de dos razas (Reyes 1995).
- Permite producir *in vitro* embriones de sexo conocido utilizando semen sexado haciendo posible una racionalización de la explotación de hatos (Reyes 1995).
- Producir embriones de vacas donantes de alto valor, con problemas reproductivos (adherencias en los ovarios y el oviducto, obstrucción de oviductos, baja respuesta superovulatoria, desarrollo de quistes ováricos, infecciones genitales) (Díez *et al.* 2010).

La producción de embriones *in vitro* consta de cuatro fases fundamentales:

#### **Obtención de oocitos:**

Vacas de alto valor genético para producción de leche y carne son descartadas por culminar su ciclo productivo, la recuperación de sus gametos es una alternativa para potenciar la fuente genética del hato utilizando FIV de embriones, que pueden ser el resultado de una operación quirúrgica que consiste en extirpar uno o ambos ovarios (ovariectomía) o del matadero (Aller *et al.* 2015).

Los ovarios contienen folículos que se encuentran en diferentes estadios de desarrollo, la recolección de oocitos permite aprovechar folículos no ovulatorios, que en condiciones fisiológicas normales sufrirían destrucción espontánea (atresia).

Los oocitos son obtenidos por aspiración folicular usando una aguja 18g y una jeringa de 10 mL, los oocitos que tengan un tamaño de entre 2 a 8 mm son los seleccionados, ya que presentan buenas condiciones de desarrollo (Fernández *et al.* 2010).

Para la selección de oocitos se toma en cuenta tres criterios: diámetro de los oocitos, aspecto de su citoplasma y las características de las células del *cumulus oophorus* que los rodea. El diámetro determina la capacidad para madurar, si se tiene un oocito menor a 110  $\mu\text{m}$  se dice que está en fase de crecimiento y no tiene capacidad para madurar.

Los oocitos que presentan un *cumulus oophorus* compacto tienen mayores porcentajes de maduración, fertilización y desarrollo hasta la etapa de blastocitos que los que solo presentan corona radiata (Stojkovic *et al.* 2001).

Los oocitos que presentan un ooplasma más oscuro tienen una mayor acumulación de lípidos y buen potencial de desarrollo que los que presentan una coloración pálida.

Sin embargo, cuando los oocitos presentan una coloración negra significa que estos están envejecidos y su potencial de desarrollo es muy bajo (Nagano *et al.* 2006).

### **Maduración *in vitro*:**

Consiste en generar oocitos maduros que soporten un desarrollo embrional preimplantatorio, esta fase determina el rendimiento en la producción de embriones *in vitro*, ya que si se maduran oocitos en condiciones desfavorables la meiosis y la fecundación se bloquean mientras que cuando la técnica usada tiene algunas imperfecciones, éstas se logran observar hasta la formación de blastocitos o hasta la implantación (Gilchrist y Thompson 2007).

La evaluación de los oocitos maduros se centra en la observación cuando las células del *cumulus oophorus* han llegado a su nivel máximo de expansión. La eficiencia de la maduración *in vitro* y la fertilización está relacionada con el medio de cultivo, este debe proporcionar a los oocitos fuentes energéticas, proteicas, minerales, antibióticas y hormonales que son necesarias para que presenten un buen desarrollo (Memili *et al.* 2007). Se debe proporcionar condiciones fisicoquímicas que figuren el ambiente natural en el oviducto como temperatura, pH, presión osmótica y la composición atmosférica (Yang *et al.* 1998)

### **Fecundación de oocitos maduros:**

En esta fase se realizan tres actividades importantes: la selección de oocitos según su calidad, deben presentar un citoplasma homogéneo y un corpúsculo polar comprimido; la segunda actividad es la selección de espermatozoides según la viabilidad que presenten y finalmente se realizará la fertilización.

### **Cultivo de embriones:**

Durante los días de desarrollo embrionario se realiza la evaluación en cada etapa. La cantidad evolucionada de embriones depende del estado de desarrollo de los mismos y estos a la vez con su medio de desarrollo. Los días de desarrollo fueron identificados de acuerdo a Palma (2001; Anexo1)

Para obtener un buen cultivo de embriones es esencial conocer los medios de cultivo que de acuerdo a sus características se clasifican en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y cocultivo con células somáticas; semidefinidos, cuando se omite el cocultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona (Herradón *et al.* 2007)

Los medios simples más utilizados para el cultivo de los embriones bovinos son: fluido oviductal sintético, con base a los componentes encontrados en el fluido oviductal ovino, y Potassium Simplex Optimized Medium KSOM (Liu y Foote 1995), proporcionando el constante interés por encontrar componentes para la vigorosa nutrición de los embriones.

El objetivo principal del estudio fue desarrollar el proceso de fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano, utilizando el protocolo propuesto por el laboratorio francés Genes Diffusion. Determinando las siguientes variables: porcentaje de maduración *in vitro*, porcentaje de fertilización *in vitro*,

porcentaje de clivaje, porcentaje de apoptosis, porcentaje de embriones obtenidos (blastocistos). Para el análisis de los datos se utilizaron procedimientos de estadística descriptiva, así como el soporte de hojas de Excel para la elaboración de cuadros y gráficos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se llevó a cabo entre agosto de 2014 y septiembre de 2015 en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, (EAP) Zamorano, ubicado a 32 km. de Tegucigalpa, con una altura promedio de 800 msnm, precipitación y temperatura promedio anual de 1100 mm y 24°C respectivamente.

Se utilizaron ovarios de matadero, obtenidos de la planta de cárnicos de la empresa Delikatessen ubicada en el Valle del Yeguaré a 5 km de la EAP Zamorano. Una vez sacrificada la hembra se extrajo los ovarios y se mantuvieron en la solución de transporte a 35°C.

### **PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS**

#### **Solución Salina de Transporte de ovarios (0.9%)**

Solución salina al 0.9% (NaCl 9 g por litro) en agua bidestilada. Se colocó una etiqueta con: “Solución Salina al 0.9% y la fecha de elaboración”, se puede almacenar indefinidamente a 4°C.

#### **Medio de Lavado de Oocitos.**

1. Se utilizó un medio TCM-HEPES199 Sigma (M7528) y se adicionó 1mL de solución BSA (A9647) por 500mL.
2. Se prepararon alícuotas de 10 mL y se conservó a 4°C.

Solución BSA (A9647): 2g de BSA /10mL de agua destilada, se filtró con filtros stérivex GS 0.22. Se prepararon alícuotas de 10 mL y se conservó a -20°C.

#### **Medio de Maduración de Oocitos (CCOs)**

1. Se preparó la base de medio de maduración, a la solución de TCM199 (M4530) se adicionó 600µL de penicilina (PENK)-estreptomina (S6501) (constituida en alícuotas de 10 000 UI/mL) por 100mL.
2. Se almacenó como TCM199 + P/S y conservó a 4°C hasta su uso.
3. Al día de la colecta de ovarios, a 9.6 mL de TCM199 + P/S se adicionó 100µL de PG 600, 20µL de mezcla de factores de crecimiento y 250µL de ITS.

## Medio de Fecundación

Cuadro 1. Solución Stock Heparina.

Producto	Referencia	Cantidad	Concentración
H <sub>2</sub> O	W1503	10mL	
Heparina Porcina	H3149	A calcular por cada lote	1700 UI por los 10 mL de agua

Se calculó y filtró (0.22 $\mu$ ), se conservó en alícuotas a -80°C.

Cuadro 2. Medio de base T.

Producto	Referencia	Cantidad
H <sub>2</sub> O	W1503	0.5L
NaCl	S5886	3.3g
KCl	P5405	0.12g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	S5011	0.02g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	S7902	0.15g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	M2393	0.05g
Rojo de fenol	P0290	1mL
Gentamicina	G1272	2.5mL

Se determinó la presión osmótica aproximadamente a 220mOsm, se filtró (0.22 $\mu$ ) y conservó a 4°C.

Cuadro 3. Medio Ferti sin BSA.

Producto	Referencia	Cantidad
Stock Base T		150mL
Lactato de Sodio	L4263	0.46mL
Piruvato	P3662	0.0165g
Bicarbonato de Sodio	S5761	0.3g

Se determinó la presión osmótica entre 275 y 305mOsm.

Cuadro 4. Medio de Fecundación.

Producto	Referencia	Cantidad
Ferti sin BSA		10mL
BSA-FAF	A6003	0.06g
		Filtrar 0.22 $\mu$
Heparina Porcina	H3149	100 $\mu$ l

### **Preparación del medio 10x SP-TL:**

Se preparó la solución común de 10x SP-TL, se disolvió lo siguiente:

1. En 100 mL de agua:

NaCl - 4.675g

KCl - 0.23g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O - 0.40g

HEPES 2.38g

2. Se ajustó el pH a 7.3, se filtró para esterilizar y almacenar indefinidamente a 4°C.

### **Percoll 90%**

1. Se colocó 4mL de 10X SP-TL en un vaso volumétrico pequeño y se agregó 0.084 g de bicarbonato de sodio y 90 $\mu$ L de Lactato de Sodio.

2. Se mezcló hasta que el bicarbonato se disolvió.

3. Se agregó 36mL Percoll.

4. Se agregó 158 $\mu$ g de MgCl<sub>2</sub> y 78 $\mu$ g de CaCl<sub>2</sub>.

5. Mientras se mezcló, se ajustó el pH a 7.3-7.45 y se filtró, con un filtro de 0.45 micras (en un tubo filtrante de 50mL o filtro similar de botella filtro con tapa). Al formarse un precipitado en la solución de Percoll, se continuó revolviendo. Al no disolverse los compuestos es recomendable repetir el proceso. Es muy fácil la precipitación si el ácido o la base se agregan rápidamente durante el ajuste del pH. Por lo tanto, se recomienda que este paso se ejecute lentamente.

## Medio de Cultivo de Embriones

### SOF (Fluido Sintético de Oviducto)

Cuadro 5. Stock A

Producto	Cantidad
H <sub>2</sub> O	45mL
NaCl	3.145g
KCl	0.267g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.081g
MgSO <sub>4</sub>	0.091g
Lactato de sodio	0.3mL

Se Filtró a (0.22μ) y conservó a 4° C. Plazo utilizable de 2 meses.

Cuadro 6. Stock B

Producto	Cantidad
H <sub>2</sub> O	50mL
NaHCO <sub>3</sub>	1.050g
Rojo de fenol	200μL

No se filtró. Se preparó cada semana.

Cuadro 7. Stock C

Producto	Cantidad
H <sub>2</sub> O	50mL
Piruvato de sodio	0.400g

No se filtró. Se preparó cada semana.

Cuadro 8. Stock D

Producto	Cantidad
H <sub>2</sub> O	50mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.310g

Se Filtró a (0.22μ) y conservó a 4° C. Plazo utilizable de 2 meses.

Cuadro 9. Medio SOF

Producto	Cantidad
H <sub>2</sub> O	39mL
Sodio tri-citrato	0.005g
Myo-inositol	0.025g
Stock A	5mL
Stock B	5mL
Stock C	0.5mL
Stock D	0.5mL
BME	1.5mL
MEM	0.5mL
Glutamina	50μL
Gentamicina	0.250mL

Se preparó cada semana. Presión osmótica oscila entre 270-285mOsm. Se Filtró a (0.22μ) y conservó a 4° C.

Cuadro 10. Medio de cultivo

Producto	Cantidad
SOF	10mL
BSA	0.040g
ITS	50μL

Se Filtró a (0.22μ)

### **Preparación de 200X de Piruvato de sodio:**

Se esterilizó y filtró 0.88g en 100mL H<sub>2</sub>O. Almacenándolo por un mes a 4<sup>0</sup>C. (Se cubrió el frasco con papel aluminio para que no reciba luz).

### **Protocolo de Fertilización *in vitro*. (Laboratorio francés Genes Diffusion)**

#### **Lavado de los ovarios**

Una vez que llegaron los ovarios al laboratorio, se lavaron con la solución salina de transporte, luego fueron depositados en un recipiente con Cloruro de Sodio (NaCl) al interior del baño maría a 39°C, permaneciendo así hasta su uso.

#### **Recolección de los oocitos**

El día de la colecta de ovarios en la mañana se prepararon las cajas de maduración de 4 pozos nunc<sup>®</sup> mismas que contenían 500μL de medio de maduración de oocitos en cada pozo y fueron introducidas en incubadora a 2 gases (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) a 38.5°C, con el

fin de gasificarlas por lo menos 3 horas antes de depositar los oocitos. Las placas fueron identificadas con iniciales y fecha.

Procedimiento:

**Antes de ir al matadero:**

1. Se introdujo 3 botellas de solución salina (700mL c/u) en la incubadora a 39°C que van a servir para transportar los ovarios.
2. Se preparó 3 botellas de un litro de 9g/L de NaCl (solución salina) y se almacenaron en el refrigerador de la sala FIV.
3. Se preparó una nevera portátil, tijeras, overol, casco, guantes y botas.

**Colecta de ovarios en el matadero:**

1. Se colocó las botellas de solución salina y acumuladores de calor a la nevera portátil.
2. Las botellas con NaCl fueron colocadas en el baño maría (39°C) donde se efectuó la punción.
3. Se colocó los tubos de 10mL de medio de lavado en el baño maría de la pieza de FIV (zona aséptica).
4. Se necesitaron 2 tubos por cada tubo de 15 mL de líquido folicular con los ovocitos.
5. Al llegar al matadero se adicionó agua a 38°C dentro de la nevera portátil donde se encontraban las botellas de solución salina con el fin de mantener la temperatura.
6. Los ovarios fueron recuperados de la cadena de sacrificio y fueron conservados dentro de solución salina para su transporte al laboratorio.

**Punción de ovarios:**

1. Se aspiraron los folículos de 2 a 8mm de diámetro utilizando una aguja 18g y una jeringa de 10mL y se depositó el líquido recuperado en tubos Corning de policarbono de 50 mL previamente puestos en el baño maría (Alrededor de 15 mL por tubo).
2. Se colocó los tubos en el baño maría de la pieza FIV y se dejó reposar 10 minutos para provocar la precipitación de los ovocitos.

**Maduración:**

1. Para cada tubo de 15 mL de líquido folicular se preparó 1 caja de Petri cuadrada y una caja de 100mm a cuatro compartimentos con medio de lavado.
2. Después de los 10 minutos, se aspiró el sedimento 2 veces utilizando una pipeta P1000 y se pasó el contenido a la caja cuadrada para proceder a seleccionar el complejo ovocito cumulus (COC'S).
3. Se seleccionaron los COC'S provistos de un citoplasma oscuro y homogéneo y de un COC'S completo y se transfirieron a la caja de cuatro compartimentos, para su posterior lavado entre el 1er y 4º compartimento.
4. Se transfirió por grupos de 50 a 80 COC'S al pozo de lavado y luego al pozo de maduración.
5. Finalmente se introdujo las cajas de maduración a la incubadora a 2 gases durante 24 horas.

### **Fecundación:**

1. Se prepararon las cajas de fecundación adicionando 500 $\mu$ L de medio de fecundación en los pozos de lavado y 250 $\mu$ L en los pozos de fecundación e introduciendo las cajas a la incubadora a 2 gases
2. Se depositó 3mL de medio de fecundación en un tubo de 15mL, se rotuló como medio de lavado para espermatozoides.
3. Fue llevado a la incubadora de CO<sub>2</sub> por lo menos 2 horas antes de la fecundación.

### **Preparación del semen.**

Pasadas dos o tres horas y calculando que coincida con las 20 a 24 horas de maduración de los oocitos, se procedió de la siguiente manera.

1. Con una pipeta plástica se colocó muy lentamente el Percoll al 90% en el fondo del tubo del Percoll al 45%, sin perturbar el medio. Se observó el menisco de separación entre el Percoll al 90% abajo y el Percoll al 45% arriba. Se llevó cuidadosamente a la estufa.
2. Se sacó del congelador el eppendorf que contenía la solución de Penicilina, Hipotaurina y Epinefrina (PHE), se cubrió con papel de aluminio y se colocó en la estufa, así mismo, se colocaron los contenedores de la centrífuga y las pipetas plásticas.
3. Se preparó el microscopio para evaluar el semen.

Se prepararon la tijera y la pistola de inseminación previamente desinfectada en un área totalmente aséptica desinfectada con etanol.

Con el fin de evitar el choque de frío a los espermatozoides se trabajó cerca del calentador.

1. Se sacó tres pajuelas de semen de toros diferentes, se descongelaron por 45 segundos a 35°C. Se secó perfectamente.
2. Se cortó y empujó el semen sobre el Percoll que estaba en la estufa con mucha precaución. El semen se coloca sin perturbar el medio, encima del gradiente de 45%.
3. Se colocó las tres pajuelas sobre el Percoll y luego se ubicó el tubo en el contenedor de la centrífuga que estaba en la estufa.
4. Se centrifugó a 300g durante 20 minutos a 22°C.

Mientras tanto se sacaron las placas con los oocitos maduros y se transfirieron a la placa de lavado con medio de fecundación sobre la platina calentadora.

1. Se lavaron una vez en los diferentes pozos (normalmente se hacen grupos de 30), tratando de hacer ya los grupos de 30 oocitos para facilitar y agilizar la transferencia.
2. Una vez lavados los oocitos, se sacó la placa de fertilización y se transfirieron con la pipeta Drummond 30 oocitos por pozo.
3. Volver a llevar la placa para la incubadora de CO<sub>2</sub>.

Una vez terminado los 20 minutos de centrifugación, se extrajo el pellet con una pipeta Pasteur atemperada y se colocó en el tubo rotulado como medio de lavado de espermatozoides.

1. Se tomó únicamente el pellet porque el Percoll es tóxico para los espermatozoides. No debe perturbarse el medio.
2. Se colocó el tubo en un contenedor de la estufa y se llevó a centrifugación a 200 revoluciones por 10 minutos.
3. Se eliminó el excedente, sin perturbar el medio para dejar únicamente el pellet.
4. Si se mezcla el medio es recomendable centrifugar nuevamente. Este procedimiento se realizó rápidamente porque los espermatozoides comienzan a moverse del pellet.
5. Se tomó una muestra y se observó al microscopio la motilidad individual de los espermatozoides sin usar laminilla. Mientras tanto el semen se dejó en la estufa.

En lo posterior se sacaron las placas de fertilización de la incubadora de CO<sub>2</sub> y se colocaron sobre la platina calentadora.

1. Una vez efectuada la dilución (se utilizó medio de fecundación).
2. Se ajustó 250µL de la suspensión de espermatozoides en cada uno de los pozos de fecundación y se anotó la hora como referencia del inicio del cultivo el día siguiente.
3. Se tomaron las dosis de la mitad de la suspensión y se agregó 25µL de PHE que permanecía en la estufa.
4. Se llevó la placa a la incubadora en un periodo de 18 a 20 horas.

#### **Cultivo de embriones.**

1. Se preparó gotas de cultivo de 30µL, 3 gotas de lavado por una de cultivo. En total 4 columnas de 4 gotas para cajas de 7cm.
2. Se adicionó delicadamente 8mL de aceite mineral dentro de las cajas.
3. Se introdujo las cajas a la incubadora 2 gases durante toda la noche.
4. Por cada pozo de fecundación se ocupó 2 tubos de 1.4mL (eppendorf) de medio de lavado en el baño maría y dos cajas de Petri de 3cm, una vacía y una con 2mL de medio de lavado, todo sobre la placa térmica (39°C).

Una vez cumplidas las 18 horas de fecundación.

1. Se recuperó los embriones de la caja, se los introdujo en uno de los tubos que contienen medio de lavado y se agregó 100µL de hialuronidasa.
2. Se pasó el tubo que contiene los embriones al vortex durante 2 a 3 minutos, con el fin de eliminar las células del *cumulus* presentes alrededor de los embriones.
3. Se aspiró el contenido del tubo con una pipeta y se lo colocó en la caja de Petri vacía, posteriormente se agregó al tubo 2mL más de medio de lavado y se realizó un segundo pasaje por el vortex para recuperar el total de embriones.
4. Se lavó los embriones y se los ubicó en la segunda caja de Petri (3cm) que contiene medio de lavado.
5. Se contaron los embriones y se los pasó por grupos de 25 a 30 sobre la primera gota de lavado en las cajas de cultivo; es recomendable cambiar la punta de la pipeta cada vez para evitar pasar aceite a la caja de Petri que contiene los embriones.
6. Cuando todos los embriones estaban en la primera gota de lavado se los pasó por las dos gotas siguientes y finalmente se depositaron en la última gota (gota de cultivo).

7. Cuando todos los embriones estaban en la columna de gotas de cultivo se introdujo las cajas de cultivo en la incubadora a 2 gases (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) a 39°C

Se realizó el seguimiento del cultivo a día 3(5-8 células), 5 (mórulas), 6, 7, y 8 (blastocitos) y tasa de eclosión, mismos que son representados en la sección de resultados y discusiones.

Se determinaron las siguientes variables: porcentaje de maduración *in vitro*, porcentaje de fertilización *in vitro*, porcentaje de clivaje, porcentaje de apoptosis, porcentaje de embriones obtenidos (blastocistos) al séptimo día. Para el análisis de los datos se utilizaron procedimientos de estadística descriptiva, así como el soporte de hojas de Excel para la elaboración de cuadros y gráficos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Recolección de oocitos.

Utilizando la técnica de punción ovárica se punzaron 36 ovarios obteniendo 241 oocitos, de los cuales 90 (37.34%) oocitos se clasificaron como degenerados por no presentar un desarrollo adecuado de las Células del *Cumulus Oophorus* (CCO) encontrándose sin ellas (desnudos); 151 oocitos (62.66%) fueron viables dando como promedio 4.03 oocitos viables por ovario (Cuadro 11; Figura 1).

El porcentaje de oocitos viables extraídos obtenidos es similar a los alcanzados por Martínez Quintero y García Recillas (2013) quienes empleando el método de punción ovárica con jeringa obtuvieron 65.76% de oocitos viables y 34.23% de oocitos degenerados; al igual que el estudio de activación de ovocitos de alpaca vitrificados después de maduración *in vitro* realizado por Ruíz *et al.* (2011) quienes reportan un 69% de oocitos viables y 31% de oocitos degenerados. Sin embargo, el estudio realizado por González *et al.* (1992) en la comparación de dos métodos de recolección de ovocitos de ovarios (aspiración folicular y seccionamiento) muestran resultados de 40.3%, 48.3%, 10.9% oocitos clases A, B y C respectivamente por el método de aspiración folicular.

El promedio de oocitos viables por ovario es similar a los reportados por Martínez Quintero y García Recillas (2013) con un promedio de 4.2 oocitos viables por ovarios; a diferencia, de lo encontrado por Kumar (2014) quien reporta 3.35; de la misma manera Ruíz *et al.* (2011) obtuvieron 3.5 complejos ovocito- cumulus (COC's) por ovario.

Cuadro 11. Número de oocitos recuperados utilizando la técnica de punción ovárica.

Repetición	Número de ovarios punzados	Número de oocitos extraídos	Número de oocitos degenerados	Número de oocitos viables extraídos	Promedio de oocitos viables por ovario
1	20	176	67 (38.07%)	109 (61.93%)	5.45
2	16	65	23 (35.38%)	42 (64.62%)	2.6
Total	36	241	90 (37.34%)	151 (62.66%)	4.03

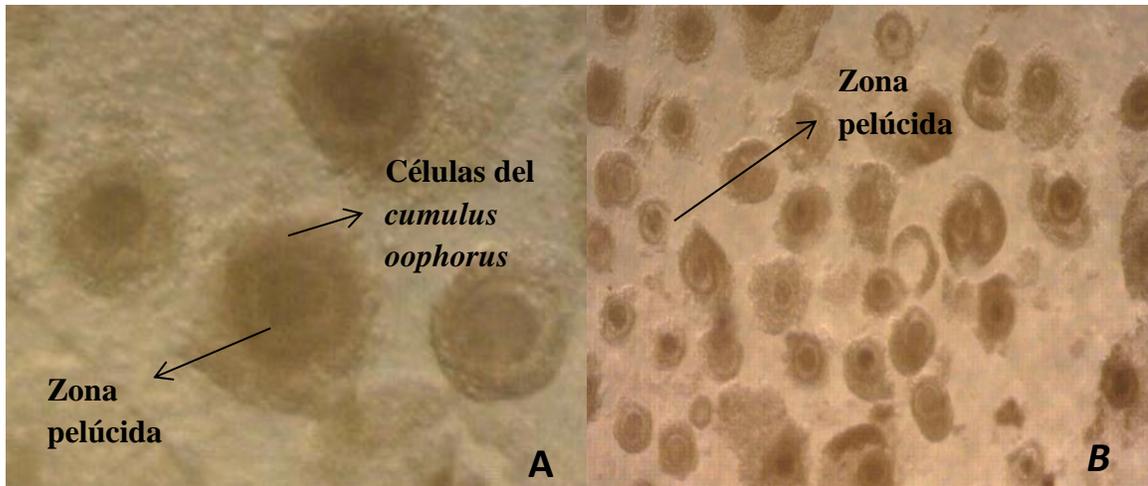


Figura 1. Oocitos obtenidos mediante punción ovárica con sus estructuras. A) Oocito viable B) Oocito degenerado.

### **Porcentaje de maduración *in vitro*.**

Se colocaron a madurar 151 oocitos viables, de estos se seleccionaron 112 (74.17%) los que poseían un *Cumulus Oophorus* denso el cual cubría el total de oocito con un citoplasma uniformemente granulado y obscuro, mientras que 39 oocitos (25.83%) no maduraron (Cuadro 12; Figura 2).

El estudio realizado por Kumar (2014) quien suplementó el medio TCM 199 con las hormonas FSH y Gonadotropina arroja porcentajes superiores a los resultados de este estudio 76.66% con la hormona FSH y un porcentaje inferior 69.7% con la hormona Gonadotropina. Sin embargo, Ratto *et al.* (1999) obtuvieron un 93.7% de ovocitos madurados utilizando como medio de maduración TCM 199 suplementado con suero fetal bovino inactivado 10% (SFB2), hormona folículo estimulante (NIH-FSH-P1), estradiol, piruvato de sodio y sulfato de gentamicina.

Según el estudio de Landínez *et al.* (2010) en el que se evaluó el efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica, a las 23 horas de cultivo se obtuvo un 59.71% y a las 26 horas un 83% de ovocitos madurados, indicando que la proporción de ovocitos en metafase II aumenta significativamente con el incremento en el tiempo de cultivo, no así la tasa de degeneración.

Cuadro 12. Porcentaje de Maduración *in vitro* (MIV)

Repetición	Número de oocitos iniciales	Porcentaje de oocitos madurados	Porcentaje de oocitos no madurados
1	109	77.98% (85)	22.02% (24)
2	42	64.29% (27)	35.71% (15)
Total	151	74.17% (112)	25.83% (39)

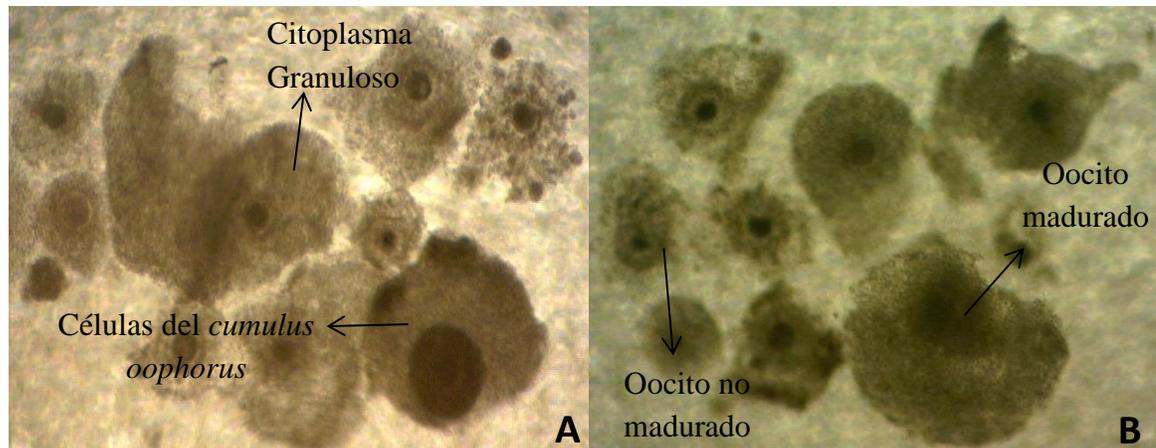


Figura 2. Oocitos obtenidos de maduración *in vitro*. A) Partes de un oocito madurado B) Oocito madurado y no madurado

### Porcentaje de oocitos fertilizados.

De los 112 oocitos madurados se obtuvo un porcentaje de fertilización de 78.57% (88 oocitos) y 21.43% (24 oocitos) oocitos no fecundados en medio de fecundación con Heparina porcina +PHE (Cuadro 13; Figura 3).

Martínez Quintero y García Redecilla (2013) trabajaron en la validación del protocolo de FIV (Universidad de Florida) usando el medio de fecundación IVF- TALP, obtuvieron una tasa de fertilización inferior a la de este estudio 43.53%, a diferencia de Cabrera *et al.* (2013) quienes utilizaron el medio IVF- TALP + PHE obteniendo tasas de fertilización de 56.8- 72.9%.

Salgado *et al.* (2005) en su estudio sobre el efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*, concluyen que la tasa de fertilización y la concentración espermática afectan la fertilización, encontrándose la mayor proporción de oocitos con fertilización normal 74% al utilizar concentración  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Cuadro 13. Porcentaje de Fertilización *in vitro*.

Repetición	Número de oocitos iniciales	Porcentaje de oocitos fertilizados	Porcentaje de oocitos no fertilizados
1	85	77.65% (66)	22.35% (19)
2	27	81.48% (22)	18.52% (5)
Total	112	78.57% (88)	21.43% (24)

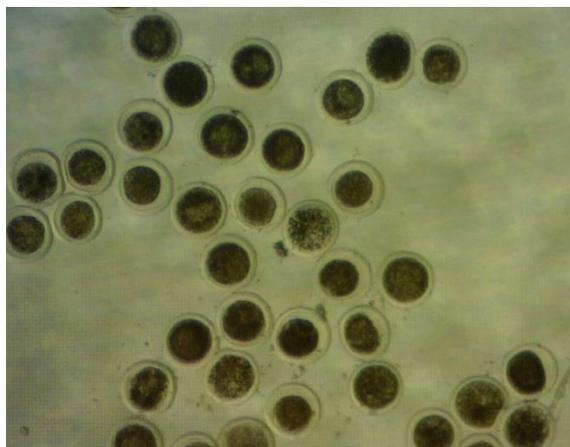


Figura 3. Oocitos fertilizados en el día uno del proceso de fertilización *in vitro*.

### Porcentaje de clivaje y apoptosis.

La división celular embrionaria (clivaje) obtenida fue de 60.20% (53 oocitos) (Cuadro 14; Figura 4). Konrad *et al.* (2013) realizaron un estudio de producción de embriones de búfalo por fertilización *in vitro* luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado usando tres tratamientos y obtuvieron un 78% de clivaje en el primer tratamiento (vaca sin transporte), 70% de clivaje ( vaca transporte 18 horas) y 34% de clivaje (búfala transporte 18 horas) presentando los dos primeros tratamientos un mayor porcentaje y el tercer tratamiento un menor porcentaje a comparación de los obtenidos en nuestro estudio.

López *et al.* (2007) analizaron el efecto del co-ocultivo sobre el desarrollo temprano de embriones clivados a las 48 horas post inseminación y obtuvieron valores de 37%, 32%, 31% y 43% siendo estos datos menores a los obtenidos en este estudio.

En este estudio la muerte celular (apoptosis) obtenida fue de 39.80% (35 oocitos) (Cuadro 14; Figura 5). Martínez Quintero y García Recillas (2013) realizaron la validación de un protocolo de fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano y obtuvieron un 44.5% (45 oocitos) de apoptosis el cual es mayor al

obtenido en este estudio. Isaza *et al.* (2009) compararon dos medios de cultivo de embriones: el KSOMaa y CR1aa alcanzando un porcentaje de apoptosis de 44% y 83% respectivamente, estos valores son mayores a los obtenidos en este estudio.

Cuadro 14. Porcentaje de clivaje y apoptosis.

Repetición	Oocitos fertilizados	Oocitos fertilizados en proceso de clivaje	Oocitos fertilizados en proceso de apoptosis
1	66	62.10% (41)	37.90% (25)
2	22	54.50% (12)	45.50% (10)
Total	88	60.20% (53)	39.80% (35)

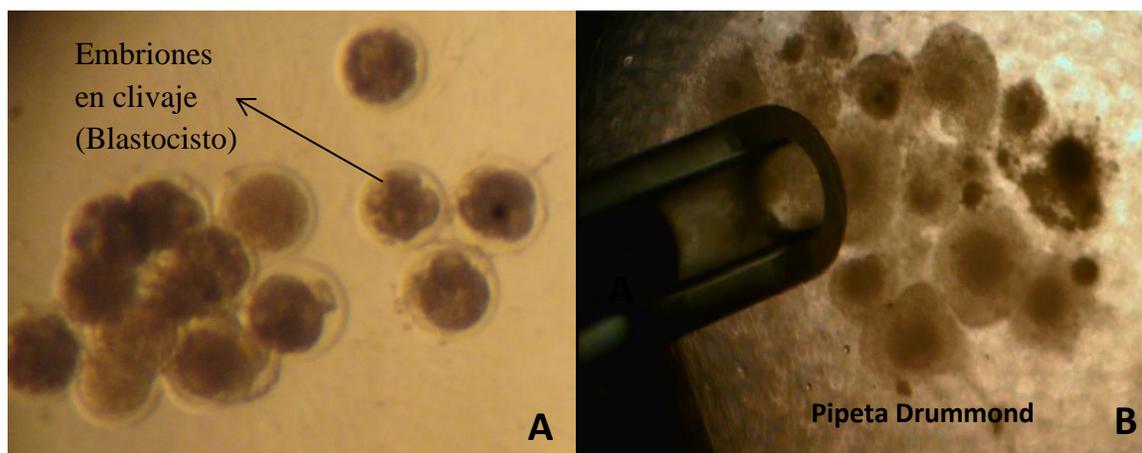


Figura 4. Embriones en clivaje obtenidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de la EAP Zamorano. A) Estados embrionarios de clivaje. B) Selección de blastocistos con la pipeta Drummond.



Figura 5. Embriones en apoptosis.

### Porcentaje de blastocistos al séptimo día.

Según el estado embrionario al séptimo día llamado blastocisto, se obtuvo 56.60% (30 blastocistos) utilizando el medio SOF (Cuadro 15; Figura 6).

Las características del desarrollo del embrión *in vitro* fueron las adecuadas, concordando con Díez (2003) quien en su estudio sobre Congelación de embriones bovinos producidos *in vitro* manifiesta que durante el desarrollo *in vitro* los embriones se ven expuestos a choques térmicos, fuentes luminosas, atmósfera gaseosa (5% de CO<sub>2</sub> en aire) y las condiciones del cultivo puede aportar exceso o carecer de los nutrientes necesarios, logrando en este ambiente una tasa de embriones viables de 40% blastocistos al séptimo día.

Los resultados obtenidos fueron inferiores a los reportados por Sánchez Sánchez (2014) quien trabajó en la comparación de dos medios de cultivo *in vitro*: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos, obteniendo un porcentaje de blastocistos al séptimo día de 43.8% y 78% respectivamente.

Dípaz *et al.* (2014) evaluaron la velocidad de desarrollo a blastocisto de embriones bovinos obtenidos *in vitro*, a los días 6, 7 y 8 post fecundación logrando una tasa de blastocistos menor a la de este estudio los días 6 y 7 (46.8%) post fecundación en medio de cultivo comercial.

Cuadro 15. Porcentaje de blastocitos obtenidos al día 7.

Repetición	Número de oocitos fertilizados en clivaje	Porcentaje de blastocistos
1	41	65.90% (27)
2	12	25.00% (3)
Total	53	56.60% (30)

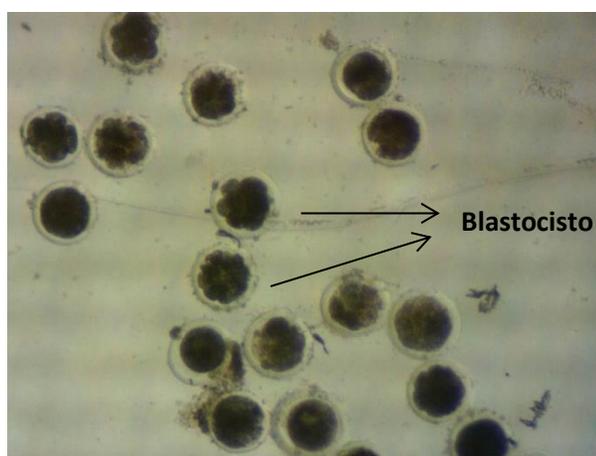


Figura 6. Blastocistos al día 7.

#### 4. CONCLUSIONES

- Utilizando el protocolo propuesto por el laboratorio francés Genes Diffusion y bajo las condiciones que presenta el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, se obtuvo similares resultados tanto de número de oocitos viables extraídos así como de oocitos viables por ovario a los resultados de la literatura citada.
- La maduración *in vitro* presentó bajos porcentajes a comparación con otros estudios similares.
- Las tasas de fertilización presentaron un índice mayor en comparación con las investigaciones citadas.
- Los índices de clivaje son menores a los encontrados en estudios realizados por otros autores y el porcentaje de apoptosis es menor a los antes mencionados.
- El porcentaje de blastocistos al día 7 es mayor comparado con el encontrado en la literatura citada.

## 5. RECOMENDACIONES

- Utilizar embriones producidos mediante este protocolo en vacas receptoras para analizar el porcentaje de implantación de los mismos.
- Realizar el protocolo con la técnica de aspiración folicular *in vivo* y comparar con la técnica de punción de ovarios de matadero.

## 6. LITERATURA CITADA

Aller, J., R. Alberio y G. Palma. 2015. Gestación con embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. Revistas electrónicas UACH. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.

Cabrera, P., K. Yoong y L. Gamarra. 2013. Evaluación de la fertilidad *in vitro* de semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados. Universidad Nacional Agraria La Molina. Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (en línea). Lima, Perú. Consultado 30 de agosto de 2015. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/36-Evaluacion\\_fertilidad\\_in\\_vitro.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/36-Evaluacion_fertilidad_in_vitro.pdf)

Díez Monforte, C. 2003. Congelación de embriones bovinos producidos *in vitro*. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. Centro de Selección y Reproducción Animal Gijón (en línea). Asturias, España. Consultado 25 de agosto de 2015. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embriionario/08-congelacion\\_embriiones.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embriionario/08-congelacion_embriiones.pdf)

Dí paz, D., E. Ancco, C. Oriundo, C. Quispe, E. Mellisho. 2014. Developmental speed to blastocyst of bovine embryos production *in vitro*. Asociación Peruana de Reproducción Animal. 4(1): 71-73.

Díez, C., M. Muñoz., J. Caamaño y E. Gómez. 2010. Biotecnologías reproductivas: producción y criopreservación de embriones *in vitro*. Gobierno del Principado de Asturias (en línea). España. Consultado 20 de Mayo de 2015. Disponible en: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>

FAO. 2012. Ganadería Mundial 2011. La ganadería en la seguridad alimentaria (en línea). Roma, FAO. Consultado 14 de Mayo de 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/i2373s/i2373s00.pdf>

FAO. 2010. Las biotecnologías ganaderas en los países en desarrollo. Biotecnologías Agrícolas en la agricultura, la silvicultura, la ganadería, la pesca y la agroindustria (en línea). Guadalajara, México. Consultado 14 de Mayo de 2015. Disponible en: <http://www.fao.org/biotech/sectoral-overviews/biotech-livestock/es/>

- Fernández, F., J. Hernández y M. Reyes. 2010. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. Revista de salud animal. Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco. México, D.F. 32(2): 21-23
- Gilchrist, R., J. Thompson. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. Theriogenology 67: 6-15.
- González, R., E. Soto., N. Delgado., G. Portillo., A. De Ondiz y J. C. Velarde. 1992. Comparación de dos métodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de Luz. 2: 10.-12
- Herradón, P.G., L.A. Quintela, J.J. Becerra, S. Ruibal y M. Fernández. 2007. Fecundación *in vitro*. Alternativa para la mejora genética en bovinos. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 15(1): 34-41.
- Isaza, V., S. Arango, A. Pareja, O. Camargo y R. Urrego. 2009. Evaluación de dos medios de cultivos sobre la producción *in vitro* de embriones bovino. Revista CES de Medicina Veterinaria Zootecnia 4(2): 39-4.
- Konrad, J., R. Scian., M. Garrido., G. Taminelli y M. Sansinena. 2013. Producción de embriones de búfalo por fertilización *in vitro* luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 24 (2): 97-101
- Kumar, J. 2014. Comparision of culture media for *in vitro* maturation of oocytes of indigenous zebu cows. Master of Science in Theriogenology. Mymensingh, Bangladesh, Agricultural University. 85 p.
- Landínez, J., P. Villamedina., H. Hernández y E. Soto. 2010. Efecto del tiempo de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 20: 659- 664.
- López, A., M. Olivera, T. Ruiz y A. Tarazona. 2007. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. Revista Medicina Veterinaria Zootecnia 12(2):1061-1067.
- Liu, Z y R.H. Foote. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O<sub>2</sub>. Biology of Reproduction 53:786-790.
- Madan, M.L. 2005. Animal biotechnology: applications and economic implication in developing countries. Revue Scientifique et Technique Office International Des Epizooties 24(1): 123-139.
- Martínez Quintero, J.L. y J. García Recillas. 2013. Validación de un protocolo de Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 29 p.

Memili, E., H. Sagirkaya, M. Misirlioglu, A. Kaya, N. First, J. Parrish. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultures in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 101: 225-240.

Nagano, M., S. Katagiri y Y. Takahashi. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote the Biology of Gametes and Early Embryos* 14(1): 53-62.

Palma, G. 2001. *Biología de la reproducción*. Argentina. Editorial Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p. 182.

Ratto, M., M. Berland., M. Wolter y R. Matamoros. 1999. Desarrollo de embriones de bovino obtenidos por fecundación *in vitro* cultivados con células oviductales o medio condicionado y transferidos a hembras receptoras. Temuco, Chile. Universidad Católica de Temuco. 25 p.

Reyes, S. 1995. Fecundación *in vitro*: Una nueva reproducción. *Revista de Extensión TecnoVet.* 2 (1): 1-3.

Ruiz, J., L. Landeo., M. Artica., M. Ratto y J. Correa. 2011. Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. Universidad Nacional de Huancavelica. Lima, Perú. 22 (3): 1-5.

Salgado, R., C. Rugeles y J. Alvarez. 2005. Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos *in vitro*. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. Universidad de Antioquía. Colombia. 18 (2): 3-6

Sánchez Sánchez, B.M. 2014. Comparación de dos medios de cultivo *in vitro*: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras. 28 p.

Stojkovic, M., S.A. Machado, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, P. Hutzler, P.B. Goncalves, P.B y E. Wolf. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biology of Reproduction* 64: 904-909.

Yang, X., C. Kubota, H. Suzuki, M. Taneja, P.E.J. Bols, G.A. Presicce. 1998. Control of oocyte maturation in cows: Biological factors. *Theriogenology*. 49: 471-482

## 7. ANEXOS

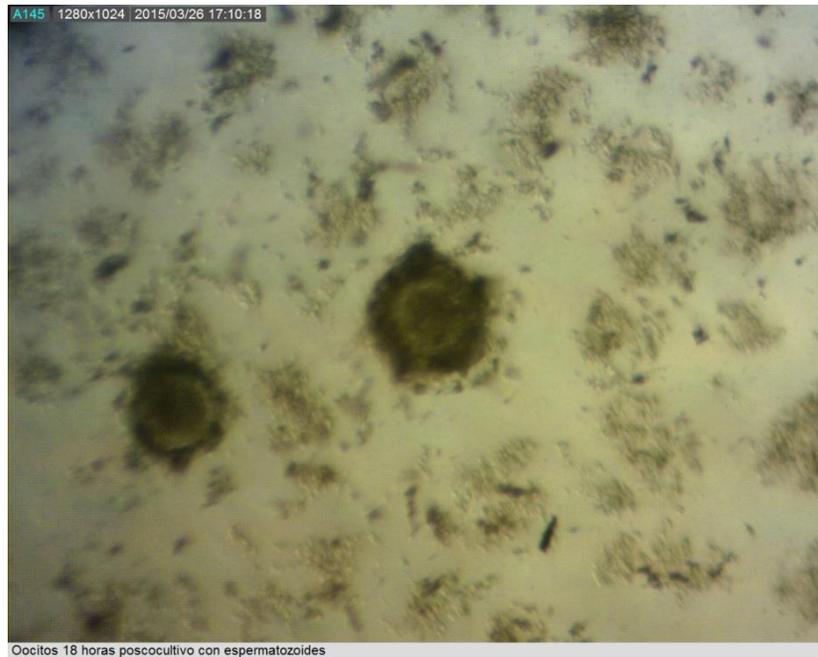
Anexo 1. Etapas del desarrollo embrionario hasta blastocistos (Palma 2001)

<b>Día</b>	<b>Descripción</b>
1	Una célula
2	Dos células
3	Cuatro células
4	Ocho células
5	Dieciséis células – Mórula Temprana
6	Mórula Compacta
7	Blastocisto temprano
8	Blastocisto expandido

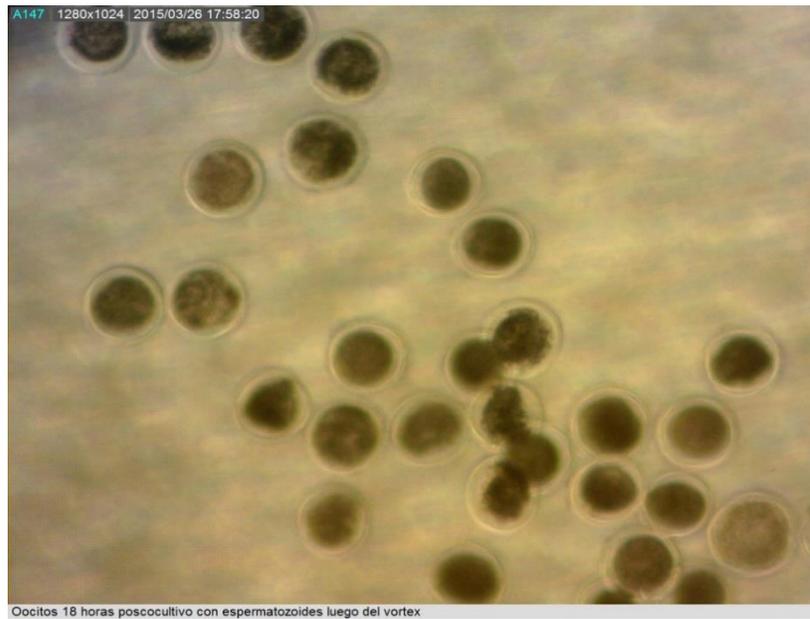
Anexo 2. Oocitos aspirados



### Anexo 3. Oocitos 18 horas poscultivo con espermatozoides



### Anexo 4. Oocitos 18 horas poscultivo con espermatozoides luego del vortex



Anexo 5. Embriones al día 3

