

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

Belinda María Sánchez Sánchez

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2014

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

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

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

Presentado por

Belinda María Sánchez Sánchez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2014

Comparación de dos medios de cultivos *in vitro*: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano

Belinda María Sánchez Sánchez

Resumen: Los medios de cultivo SOF y CR1aa son formulados con base a iones, azúcares y aminoácidos que simulen el ambiente uterino y oviductal; esta investigación se realizó con base a determinar la eficiencia en la producción de embriones comparando dos medios de cultivo SOF y CR1aa, la cantidad oocitos recolectados, el porcentaje de oocitos madurados, el porcentaje de oocitos fertilizados y la cantidad de oocitos en clivaje y apoptosis y embriones. Los oocitos se adquirieron de ovarios de vacas *post mortem* y transportados en solución salina 0.9%. En promedio de oocitos recolectados para ambos medios de cultivo fue de 3.6 oocitos/ovario; para determinar el porcentaje de oocitos maduros, estos se colocaron en medio TMC-199 suplementado, e incubados por 24 horas, para el CR1aa se obtuvo 77.1% y para SOF 85.2%. Para determinar el porcentaje de oocitos fertilizados, se colocaron únicamente los oocitos maduros en el medio de fecundación IVF-TL donde se fecundaron con espermatozoides seleccionados en medio Percoll 45% 90%, incubados por 18 horas, de la cual se obtuvo tasas de 51.4% para el medio CR1aa y 69.5% para el medio SOF de oocitos fecundados, de los cuales se pasaron a los medios CR1aa y SOF, para determinar el porcentaje de oocitos en clivaje, oocitos en apoptosis y los que alcanzaron la etapa de blastocistos al día 7-8; para el CR1aa se obtuvo 61.8% de clivaje y 38.2% de apoptosis, para el medio SOF se obtuvo 47.1% para clivaje y 52.9% de oocitos en apoptosis, el porcentaje de embriones obtenidos para el medio CR1aa fue de 43.8% y 78% para el medio SOF.

Palabras clave: Apoptosis, clivaje, *Cumulus oophorus*, medio de cultivo.

Abstract. SOF and CR1aa culture medium are formulated based to ions, sugars and amino acids that mimic the uterine and oviduct environment; this research was done in base to determine the efficiency in the embryo production comparing two medium SOF and CR1aa, the amount of collected oocytes, percentage of mature oocytes, percentage of fertilized oocytes and the amount of oocytes in cleavage and apoptosis and embryos. Oocytes were acquired from ovaries from post mortem cows and transported in a 0.9% salty solution. In average of collected oocytes for each culture medium was 3.6 oocytes/ovarium; to determine percentage of fertilized oocytes, these were disposed on supplemented TMC-199 medium, and incubated for 24 hours, for CR1aa 77.1% and SOF 85.2% were obtained. To determine percentage of fertilized oocytes, only the mature oocytes were disposed on the fecundation medium IVF-TL where were fecundated with spermatozoids selected in Percoll medium 45% 90%, incubated for 18 hours, which was obtained rates of 51.4% for CR1aa and SOF medium, to determine percentage of oocytes in cleavage, oocytes in apoptosis and the ones that reached the blastocyst stage at day 7-8; for CR1aa 61.8% cleavage, and 38.2% apoptosis was obtained for the average SOF 47.1% for cleavage and 52.9% of oocytes in apoptosis, the percentage of embryos to the medium is obtained CR1aa was 43.85 and 78% for SOF medium.

Key words: Apoptosis, cleavage, culture medium, *Cumulus oophorus*

CONTENIDO

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

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

	Cuadros	Página
1.	Formulación de los medios TL.....	5
2.	Formulación para la preparación de las soluciones TALP.	5
3.	Stock A.	6
4.	Stock B.	7
5.	Stock C	7
6.	Stock D.	7
7.	Medio SOF	7
8.	Medio de cultivo.....	8
9.	Solución stock CR1aa.....	8
10.	Preparación del medio el CR1aa suplementado.	9
11.	Porcentaje de oocitos recolectados.	14
12.	Porcentaje de maduración de oocitos en medio TMC-199.....	15
13.	Porcentaje de oocitos fertilizados.	16
14.	Porcentaje de oocitos cen clivaje y oocitos en apoptosis	17
15.	Porcentaje de embriones obtenidos con medio CR1aa y SOF.	18
16.	Eficiencia de cada etapa del proceso FIV en realción al número de embriones obtenidos en cada medio.	19
	Figuras	Página
1.	Oocitos recolectados. A) Oocito con CCO, B) Oocito desnudos.....	14
2.	Oocitos en medio de maduración A) oocitos no madurados B) oocitos 3. madurados.....	15
4.	Oocitos fecundados A) oocitos con celulas del cúmulo expandida. 5. B) oocitos Fertilizados, C) pellet de espermatozoides.....	16
6.	Embriones en apoptosis.	17
7.	Oocitos en clivaje, apoptosis y en etapa de blastosistos.....	18
8.	Embriones día 7-8. en diferentes estadíos..	19
	Anexos	Página
1.	Preparación de los medios stock.....	26
2.	Clasificación de los oocitos bovinos	27

1. INTRODUCCIÓN

En 1890 Heape demostró haber trasplantado huevos fertilizados de conejas al útero de otras conejas, el desarrollo de este fue normal. Otros experimentos semejantes fueron realizados con éxitos no solo en conejas, sino también en roedores, ovejas, vacas entre otros (Derivaux 1961); Berry y Warwick experimentaron con ovejas en 1949 la transferencia fue exitosa de un embrión de borrego y cabrito. Más tarde en los años setenta se formó la primera compañía comercial para transferir embriones bovinos y animales domésticos Alberta Livestock Transplants, Ltd. En América del Norte, en 1973 Wilmut y Rowson a partir de embriones congelados obtuvieron el primer becerro (Hafez y Hafez 2000).

En la actualidad el éxito de las explotaciones ganaderas depende de la optimización de todos los factores que afectan la producción y manejo de esta, junto con el mejoramiento genético, los niveles nutricionales y el estado sanitario. La eficiencia reproductiva es un factor importante a considerar, cuando se desea alcanzar la meta de producir un ternero al año, a su vez aumentar la producción de carne y leche, y conservar características deseadas de los mejores reproductores (Cavestany 1985).

A inicios del siglo XXI, el mejoramiento genético ha empezado a utilizar nuevas herramientas para la multiplicación rápida por medio de la implementación de nuevas técnicas reproductivas como la producción *in vitro* de embriones, clonación, sexado de semen y la inseminación artificial como la técnica más utilizada. La transferencia de embriones es un método que busca aumentar el número de descendencia por hembra (Cáceres 2011). Según Käppeli los reproductores tienen un excedente considerable de células sexuales, en la hembras se estima que los ovarios de una ternera de tres meses contiene en promedio entre 75,000 y 297,000 oocitos, ahora bien en condiciones normales de explotación ganadera el número de cría por vaca no excede de 4 a 5, la idea principal de la transferencia de embriones es recuperar el excedente de células germinales de los animales de alto valor genético (Derivaux 1961).

El desarrollo embrionario temprano puede ser llevado a cabo en diferentes medios de cultivos con una composición a base de sales balanceadas y carbohidratos como en el caso de los medios de cultivo CR1aa y SOF. Los medios de cultivos utilizados para la producción de embriones *in vitro* son formulados con base a iones, azúcares y aminoácidos que simulen el ambiente uterino y oviductal, en el momento de la liberación del ovocito, la fertilización y el desarrollo embrionario. Para desarrollar embriones estos medios son suplementados con suero bovino fetal o albumina sérica bovina (Mejía 2009).

En la producción de embriones *in vitro* este procedimiento debe tomar en cuenta la recolección de los oocitos de los folículos ováricos, luego de la colección de los oocitos se

completa la producción de embriones con tres pasos: maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y cultivo *in vitro*.

Capacitación de espermatozoides. Los espermatozoides no adquieren su capacidad de fecundación hasta que entran en contacto con el sistema reproductor femenino donde sufren cambios fisiológicos adicionales, antes que estos estén en contacto con la zona pelúcida y poder fusionarse con el vitelio de los oocitos. Muchos experimentos fallan porque los espermatozoides no son capacitados antes de la fecundación *in vitro*, el espermatozoide un vez adentro del sistema reproductor femenino permite que pase por una reacción acrosomal antes de la fecundación, esta se puede llevar a cabo *in vitro*, por medio de fuerza iónicas elevadas, ionoforos de Ca^{+2} , cafeína, incubación prolongada de 18 a 24 horas, pH elevado y lavados a través de un gradiente de percoll. Luego del descubrimiento de la heparina de glucosamino-glucano ha mejorado la capacitación de los espermatozoides, el semen es descongelado, se estimula la motilidad por medio de gradientes de densidad de percoll, luego se diluye la cantidad requerida de espermatozoides en un medio amortiguado con bicarbonato que contenga heparina, se incuban durante 4 horas (Sorensen 1979).

Maduración *in vitro* de oocitos. La mayor parte de oocitos recolectados para la producción de embriones *in vitro* se obtienen mediante la aspiración de folículos de ovarios de mataderos, en la actualidad existen nuevas técnicas para la recolección, recolectas por diseminación, cortes muy finos o aspiración; siendo la aspiración la técnica más eficiente en cuanto al tiempo para la obtención de oocitos, de los cuales solo se selecciona folículos sanos, los oocitos recolectados se maduran en medios de TCM199 con suero fetal del becerro al 10% y gonadotropinas, una vez liberados los complejos de oocitos y cúmulos de los folículos, se colocan en microgotas cubiertas con aceite mineral, en platos Petri y se incuban durante 24 horas a 39° C en un ambiente con 5% de CO_2 a 95% de humedad relativa (Hafez y Hafez 2000).

Fertilización *in vitro*. Un vez maduros los oocitos están listos para ser fecundados con espermatozoides capacitados, los espermatozoides penetran en el ovocito y desencadenan una serie de sucesos que culminan en la fecundación, el protocolo consiste en preparar microgotas de la suspensión espermática y del medio que contiene heparina, luego colocar de cuatro a cinco complejos de oocitos y cúmulos en una gota de medio de fecundación y se incuban con 5% de CO_2 , 95% de humedad relativa a una temperatura de 39 °C durante 24 horas.

La reacción del acrosoma parece ocurrir con mucha más facilidad en medios que contengan albúmina sérica bovina, durante la fecundación es importante agregar una fuente de energía, por lo general se usa glucosa o piruvato, para mantener la motilidad de los espermatozoides y el metabolismo de los oocitos; a partir de 18 a 22 horas se observan cuántos oocitos fueron fecundados lo que está ligado a la capacidad de fecundación, motilidad vigorosa de los espermatozoides y del óvulo que presenten un cuerpo polar para para ser fecundados (Hafez y Hafez 2000).

Técnicas de transferencias. Las receptoras deben ser buenas reproductoras, encontrarse libres de infecciones en el tracto reproductivo, tener ciclos estruales de duración normal y encontrarse en buena condición física. La sincronización del estro en las receptoras comienza con el inicio de la producción del embrión, este no debe ser mayor a 12 horas, ya que la tasa de gestación disminuye drásticamente entre más tiempo dejemos la sincronización de las receptoras, en ganado bovino el método de transferencia más usado es el transcervical, consiste en palpar por el recto a la vaca, para determinar si el ovario contiene el cuerpo lúteo, una vez palpado el cuerpo lúteo, se puede aplicar anestesia o no para introducir por medio de una pistola de inseminación la pajilla que contiene el embrión (Hafez y Hafez 2000).

La presente investigación tuvo como objetivo general evaluar dos medios de cultivo *in vitro* CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano y como objetivos específicos determinar el porcentaje de maduración, fertilización, clivaje y apoptosis, determinar el porcentaje de blastocistos obtenidos a los 7 días de cultivo en cada uno de los medios y la eficiencia en cada uno de los pasos del protocolo FIV en medios CR1aa y SOF.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo entre octubre del 2013 y septiembre del 2014 en el Laboratorio de Reproducción Animal de 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 Germano's ubicada en el Valle del Yegüare a 5 km de la EAP Zamorano. Una vez sacrificada la hembra se extrajeron los ovarios y fueron sumergidos 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/L) en agua bidestilada. Se colocó una etiqueta con: "Solución Salina al 0.9% y la fecha de elaboración", luego se almacenó indefinidamente a una temperatura de 4 °C.

Medio de Colección de Oocitos (Cuerpos Cúmulos Oocitos). Se disolvió el TCM-199 (sin rojo de fenol, y sin glutamina) Hyclone para 10 L, 3.50 g NaHCO₃ en 9 L de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 7.2-7.4, ajustándose el volumen a 10 L, el cual fue filtrado y esterilizado. El medio se colocó en botellas estériles de 0.5 L con 400 mL en cada botella, colocando etiquetas, indicando el contenido, la fecha e iniciales del técnico que lo elaboró, este medio se puede conservar a 4°C indefinidamente.

La noche antes de usar, se agregó lo siguiente:

Solución # 4: BSS + Heparina,

Solución # 11: glutamina (4 mL),

Solución # 15: Penicilina/Estreptomicina (4 mL).

Se cambió la etiqueta + suplementos, al igual que se cambió la fecha y se utilizó el mismo día o en un plazo de siete días.

Medio de Maduración de Oocitos. Se preparó una solución de 87 mL de TCM-199, la cual se almacenó a 4 °C hasta su uso.

La noche antes de usar, se agregó lo siguiente a la solución de TCM-199, que contenía los siguientes componentes:

Solución # 3: BSS

Solución # 8: gentamicina

Solución # 6: folltropin (125 µL)

Solución # 5: estradiol (200 µL)

Solución # 2: piruvato de sodio (1 µL)

Solución # 10: glutamina (1 µL)

Se cambió la etiqueta (TCM-199) por Medio de Maduración de Oocitos y se usó en un plazo de siete días.

Soluciones de TL – Preparación de TALPs. Para la preparación de los medios, se mezclaron los ingredientes como se describe en el cuadro 1. Se ajustó el pH, se comprobó la osmolaridad, esterilizando y filtrando la solución. Se escribió la fecha y el vencimiento en la etiqueta (se utilizó en un plazo de 7 días) los cuales se almacenaron a 4°C.

Cuadro 1. Formulación para la preparación de las soluciones del TL

Ingrediente	Sp-TL	HEPES-TL	IVF-TL
Agua (mL)	79.232	177.0	40.157
Solución 17: NaCl (mL)	4.34	10.0	2.5
Solución 18: KCl (mL)	1.96	4.0	1.0
Solución 19: bicarb (mL)	10.00	1.6	5.0
Solución 20: phosphate (mL)	1.0	2.0	0.50
Solución 1: Na-lactate (mL)	0.368	0.372	0.093
Solución 21: HEPES (mL)	1.0	2.0	0
Solución 22: Ca chloride (mL)	1.0	2.0	0.50
Solución 23: Mg chlor (mL)	1.10	1.0	0.25
pH	7.4	7.3	7.4
Osmolaridad (mOsm)	295-305	275-285	290-300

Medios TALP (“Tyrode’s Albúmina Lactato Piruvato”). Para la preparación de los medios, se mezclaron los ingredientes como se describe en el cuadro 2. Se esterilizaron y filtraron las soluciones., escribiendo la fecha de vencimiento en la etiqueta (se utilizó en un plazo de 7 días), se almacenaron a 4°C

Cuadro 2. Formulación para los medios de TALP usando suplementos y soluciones de Tecnologías Celular y Molecular.

Ingrediente	Sp-TALP	HEPES-TALP	IVF-TALP
TL (mL)	38.0**	100.0	50.0
BSA, Fracción V (mg)	240	300	0
BSA, EFAF (mg)*	0	0	300
Solución 2: piruvato (mL)	2.0	1.0	0.5
Solución 8: gentamicina (μ L)	80	150	50
Solución 7: heparina (μ L)	0	0	250***

*BSA, EFAF Albumina Sérica Bovina, Esencial Ácido-Graso, libre de la fracción V **Guarda los 12 mL restantes después de la preparación del medio para usarlo en la formulación de percoll.

***La concentración óptima de heparina varía entre toros – si un toro se utiliza con frecuencia, las concentraciones de heparina se comprueban en un experimento preliminar de percoll.

Preparación del medio 10x SP-TL. Se preparó la solución común de 10x SP-TL disolviendo lo siguiente:

En 100 mL de agua:

NaCl - 4.675 g

KCl - 0.23 g

NaH₂PO₄+H₂O - 0.40 g

HEPES 2.38 g

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

Percoll 90%. Se colocó 4 mL de 10X SP-TL en un vaso volumétrico pequeño y se agregó 0.084 g de bicarbonato de sodio y 90 μ L de lactato de sodio (solución 1). Se revolvió hasta que el bicarbonato se disolviera, agregándose 36 mL Percoll. Luego, se agregaron 158 μ g de MgCl₂ (solución 12) y 78 μ g de CaCl₂ (solución 13).

Se removió, ajustándose el pH a 7.3-7.45 y se filtró, con un filtro de 0.45 μ (en un tubo filtrante de 50 mL o filtro similar de botella filtro con tapa). Se removió constantemente, la solución de Percoll, evitando observar un precipitado. Si los compuestos no se disuelven, se deberá recomenzar el proceso. La precipitación se realiza de una forma sencilla, si el ácido o la base se agregan rápidamente durante el ajuste del pH. El procedimiento se realizó lentamente.

SOF (Fluido Sintético de Oviducto)

Cuadro 3. Stock A^ϕ

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

^ϕ Filtrar a 0.22 μ. Conservación 4° C. Utilizarlo en plazo máximo de 2 meses.

Cuadro 4. Stock B^ϕ

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

^ϕ No filtrar. A preparar cada semana

Cuadro 5. Stock C^ϕ

Producto	Cantidad
H ₂ O	59 mL
Piruvato de sodio	0.400 g

^ϕ No filtrar. A preparar cada semana

Cuadro 6. Stock D^ϕ

Producto	Cantidad
H ₂ O	50 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.310 g

^ϕ Filtrar a 0.22 μ. Conservación 4° C. Utilizarlo en plazo máximo de 2 meses.

Cuadro 7. Medio SOF^ϕ

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

^ϕPreparar cada semana. Verificar la presión osmótica que debe oscilar entre 270-285 mOsm. Filtrar 0.22 μ. Conservación 4° C.

Cuadro 8. Medio de cultivo^ϕ

Producto	Cantidad
SOF	10 mL
BSA	0.040 g
ITS	50μL

^ϕ Filtrar a 0.22 μ

Preparación de 200X de Piruvato de sodio. 0.88gr → 100 mL H₂O → Esterilizar y filtrar. Se debe almacenar por un mes a 4⁰C. (Se debe cubrir el frasco con papel aluminio para que no reciba luz).

CR1aa (Charles Rosenkrans 1 amino-ácidos)

Cuadro 9. Solución stock de CR1aa^ϕ

Producto	Cantidad
NaCl	0.670 g
KCl	0.023 g
NaHCO ₃	0.220 g
Piruvato de Sodio	0.004 g
Glutamina	0.015 g
Hemi-Ca lactato	0.055 g

^ϕSe toma un frasco volumétrico de 100 mL

Se agregaron los cinco primeros ingredientes al frasco volumétrico. Se agregó agua bi o tridestilada (90mL). Se disolvieron a fondo los componentes y después se agregó el lactato Hemi-Ca. Se agregó el agua restante hasta aforar los 100 mL. Se almacenó por 2 días a 4° C.

Nota: los componentes de este medio no se deben precipitar. Reducir al mínimo las posibilidades de que esto ocurra, cerciorarse de que todos los componentes estén disueltos antes de agregar el lactato Hemi-Ca y utilizar inmediatamente después de la preparación. Si un medio aparece blanco y turbio, desechar y comenzar otra vez.

Cuadro 10. Preparación del medio CR1aa suplementado.

Producto	Cantidad
Stock CR1aa	5mL
EFAF BSA	15mg (3.00 mg/mL)
Gentamicina	2.5 µL (0.5 mL/mL) (Solución 8 A)
Aminoácidos no esenciales 100X	50 µL
Aminoácidos esenciales 50X	100 µL

Se esterilizó el medio pasándolo a través del filtro millipore de 0.22 µ utilizando una jeringuilla de 10 mL de receptáculo, intermedio entre el recipiente donde se preparó y filtró. Usar inmediatamente.

Protocolo de Fertilización *in vitro*. (Universidad de Florida 2000)

Lavado de los ovarios. Una vez que llegaron los ovarios al laboratorio, se lavaron bien con la solución de transporte (se mantuvo en la estufa a 38 °C), se cambió la solución y permaneció a 38°C hasta que se van a trabajo con la extracción de los folículos.

Recolección de los oocitos. El mismo día en la mañana, se prepararon las placas de maduración (placas de Petri redondas) 1 o 2 dependiendo del número de oocitos a recolectar. Se prepararon gotas de 50 µL de medio de maduración, se cubrieron con aceite mineral y se llevaron a la incubadora con 5% de CO₂ a 38.5°C (se colocan 10 oocitos por gota). Se rotularon las placas con iniciales y fecha.

Se mantuvieron los ovarios a una temperatura de 38°C, fue necesario utilizar guantes de látex para iniciar el trabajo, asimismo se desinfectó con etanol al 70%. Se seleccionaron los ovarios con bastantes folículos y se desecharon aquellos con cuerpos lúteos muy grandes y quistes. Los ovarios a utilizarse se colocaron en un frasco limpio con el mismo medio de transporte (Solución Salina). Se llevaron a la campana en un beaker con aproximadamente 100 mL de OCM. Se tomaron los ovarios con la pinza por todo el borde, se quitó el exceso de grasa y se comenzó a aspirar con una jeringuilla de dos piezas de 5 mL y aguja 18 × 1¹/₂, los folículos de 2 a 8 mm preferiblemente. Antes de filtrar los oocitos, se colocó el beaker en baño de María mientras se prepararon los demás. Se sacó

una placa de búsqueda y se colocó encima de la platina calentadora, además se colocó una placa Grid con OCM en los cuatro pozos. Se sacó la pipeta de transferencia (Drummond), se desinfectó la punta con etanol y se colocó la punta. Asimismo se sacó el filtro separador de células y la pinza para sujetar colocándolo sobre otro beaker pequeño. También se colocó medio (que debe estar en la estufa) en un beaker pequeño para limpiar el filtro.

Una vez aspirado el fluido folicular, se colocó el medio con los oocitos en 2-3 tubos cónicos de 50 mL y se dejó reposar 5-10 min. Luego se extrajo desde el fondo el pellets con una pipeta Pasteur y se colocó sobre el filtro. Esto se puede repetir 5 a 6 veces de cada tubo cónico. Inmediatamente se lavó el filtro encima de la placa de búsqueda (con una mínima cantidad de OCM) con una jeringa de 12 mL y una aguja $18 \times 1\frac{1}{2}$. Se lavó bien el filtro por todos los bordes. Si se observó que hacía falta medio se le agregó a la placa. Se comenzaron a buscar los oocitos y con la pipeta Drummond se fueron transfiriendo a uno de los pozos. Se comenzó a seleccionar y se fue lavando en los otros pozos del plato Grid. Una vez lavados se pueden empezar a agrupar de diez en diez para facilitar el trabajo. Se deben seleccionar oocitos bien rodeados con células del *cumulus* con citoplasma homogéneo más bien oscuro. Zona pelúcida intacta. No seleccionar oocitos expandidos, ni desnudos. La clasificación de los oocitos se presenta en el Anexo 2.

Una vez terminado los lavados, se sacó la placa de maduración de la incubadora y se transfirieron los oocitos lo más rápido posible, colocando 10 oocitos por gota de medio. Se llevaron a maduración en la incubadora, durante 20-24 horas.

Preparación de las placas de fertilización y preparación del semen. Por lo menos debe realizarse dos o tres horas antes de la fertilización, en la mañana del segundo día (es decir el día 0, porque es cuando se va a fertilizar). Todo se realiza dentro de la campana de flujo laminar, previamente desinfectada con etanol al 70%.

1. Se suplementó el medio de IVF-TALP. (Frasco de 100 mL nuevo). Lo que está en el congelador debe descongelarse).
2. Se pesó 0.6 g de BSA-EFAF, se agregó al frasco de IVF-TALP y se mezcló muy suavemente.
3. Se agregó 1 mL de Piruvato (Solución 2) (debe estar en la nevera forrado con papel aluminio).
4. Se agregaron 100 μ L de gentamicina (Solución 8). (Debe estar congelado).
5. Se agregaron 500 μ L de heparina (Solución 7). (Debe estar congelado). Mientras se dejó disolver bien el medio, se procedió a preparar los tubos cónicos.
6. Se filtró el medio de IVF-TALP a través de un filtro milipore 0.22 μ m en otro frasco estéril.

7. Se llenaron completamente 4 tubos cónicos de 15 mL con Hepes TALP (HepesTL) se taparon y se llevaron a la estufa.
8. Se agregaron 10 mL en un tubo cónico de 15 mL de Hepes TALP. Se tapó y se llevó a la estufa. Se colocó Wash en la etiqueta.
9. Se agregó 5 mL de IVF-TALP a un tubo cónico de 15 mL y se puso la tapa sin cerrar y se llevó a la incubadora.
10. Se prepararon las placas de fertilización de 4 pozos, según el número de oocitos que se están madurando, agregando 600 µl de IVF-TALP, calculando aproximadamente 30 oocitos por pozos llevándolos a la incubadora. No se colocó aceite mineral, se identificaron las placas con iniciales y fecha.
11. Luego se preparó el Percoll:
12. Se agregó a un tubo cónico de 15 mL, 1.5 mL de Percoll al 90% y 1.5 mL de Sperm-TALP, denominándose el Percoll al 45%.
13. Se agregó a un tubo cónico de 15 mL, 3 mL de Percoll al 90%
14. Se puso a calentar el agua donde se descongeló el semen a 37-38 °C

Fecundación de los oocitos. Pasadas dos o tres horas y calculando las 20 a 24 horas de maduración de los oocitos, se procede a preparar el semen de la siguiente manera:

Con una pipeta Pasteur plástica se colocó muy lentamente el percoll al 90% en el fondo del tubo del Percoll al 45%, sin perturbar el medio. Se debió observar el menisco de separación entre el Percoll al 90% abajo y el Percoll al 45% arriba. Se llevó cuidadosamente a la estufa.

Se sacó del congelador el eppendorf que contiene la solución de penicilina, hipotaurina y epinefrina (PHE), se cubre con papel de aluminio y se coloca en la estufa, asimismo, se colocaron los contenedores de la centrífuga y las pipetas Pasteur plásticas. Se preparó el microscopio para evaluar el semen.

Por otro lado se colocó una servilleta en el mesón y se colocó encima la tijera y la pistola de inseminación previamente desinfectada, se colocó otra servilleta encima y se desinfecta con etanol. Se preparó una placa con HepesTL que está en la estufa y se llenaron dos de los cuatro pozos y se colocó sobre la platina calentadora.

Es importante donde se va a trabajar el semen que haya un calentador, para evitar el choque de frío a los espermatozoides. Luego se sacaron tres pajuelas de semen de toros diferentes, se descongelaron por 60 segundos y se secó bien la pajuela. Se cortó y se empujó el semen sobre el Percoll que estaba en la estufa con mucho cuidado. El semen se colocó sin perturbar el medio, encima del gradiente de 45%. Se colocaron las tres pajuelas sobre el Percoll y se colocaron en el contenedor de la centrífuga que debe haber estado en la estufa. Se centrifugó a 1000 revoluciones por 10 minutos.

Mientras se esperaron los diez minutos, se sacaron las placas con los oocitos maduros y se transfirieron a la placa que está encima de la platina calentadora y se lavaron en los diferentes pozos (normalmente se hacen los grupos de 30 y se lavan una sola vez), tratando de hacer ya los grupos de 30 oocitos para facilitar y agilizar la transferencia. Una vez lavados los oocitos, se sacó la placa de fertilización y se transfirió con la Drummond 30 oocitos por pozo. Se volvió a llevar la placa para la incubadora de CO₂.

Una vez terminado los 10 minutos de centrifugación, se extrajo el pellet con una pipeta Pasteur que se encontró en la incubadora y se colocó en el tubo que contiene Sperm-TL. Se tomó únicamente el pellet porque el Percoll es tóxico para los espermatozoides. No debe perturbarse el medio. Se coloca en otro contenedor de la estufa y se llevó a centrifugación a 200 revoluciones por 10 minutos. Se botó el excedente, sin perturbar el medio y se tomó únicamente el pellet.

Si se mezcla el medio hay que centrifugar de nuevo. Este procedimiento se realizó rápidamente porque los espermatozoides comienzan a moverse del pellet. A esto se le agregó el medio IVF-TL que estuvo en la incubadora de CO₂ (se utilizó lo que más o menos carga la Pasteur). Se pipetearon muy suavemente los espermatozoides. De aquí se tomó una muestra y se observó al microscopio. Se observó la motilidad individual de los espermatozoides sin usar laminilla. Mientras tanto el semen se dejó en la estufa. Posteriormente, se sacaron las placas de fertilización de la incubadora de CO₂ y se colocó sobre la platina calentadora. Se le agregó 25 µL de semen por pozo (tomar la dosis de la mitad de la suspensión) y 25 µL de PHE que permaneció en la estufa. Se llevó la placa a la incubadora en un periodo de 18 a 20 horas.

Preparación del cultivo de los embriones. Se preparó el medio de cultivo (SOF o CR1aa) dos a tres horas antes de remover los presuntos embriones de las placas de fertilización. Se hicieron gotas de 50 µL en placas Petri de 60 × 15 mm o en placas Nunclon, estimadas, considerando colocar 30 presuntos embriones por gota. Después se cubrió con aceite mineral; se pueden preparar gotas de 25 µL, típicamente se colocan de 25 a 30 embriones en gotas de 50 µL o 5 a 10 presuntos embriones en gotas de 25 µL. Se colocaron las placas en la incubadora para equilibrar a 38.5 °C y 5% de CO₂. Se colocó en la platina calentadora una placa de Petri en X y se agregaron 5 mL de Hepes-TALP a 3 de los 4 pozos. También se colocó un beaker pequeño con Hepes-TALP. Se sacó el tubo eppendorf con la hialuronidasa del congelador y se colocó en la estufa. Una vez descongelada, se agregó con una micropipeta 0.9 mL de Hepes-TALP que estaba en la estufa más 0.1 mL de hialuronidasa, se mezcló bien y se colocó sobre la platina calentadora. Se sacó la placa de fertilización de la incubadora y se transfirieron los oocitos fertilizados con la pipeta Drummond al tubo eppendorf. Se dejó por dos a tres minutos y se extrajo el excedente del medio dejando nada más la parte final del tubo donde se encontraban los embriones. Luego se llevó al vortex durante 5 minutos, poniéndolo y quitándolo encima del vortex para agitarlos mejor. Luego se le agregó con una pipeta Pasteur plástica (estufa), Hepes-TALP se lavó bien el tubo eppendorf, incluyendo la tapa y se fue colocando en la placa en el pozo, que no tenía medio.

Luego se lavaron bien los embriones agrupándolos en grupos de 30, en cada pozo de la placa. Se lavaron dos o tres veces, luego se sacó la placa de cultivo y se transfirieron los embriones 30 por pozo a la placa de cultivo que estaba en la incubadora 2 o 3 horas antes del mencionado procedimiento. Se evaluó el porcentaje de divisiones a los tres días y porcentaje de blastocitos a los 8 días

Día 3 pos FIV- determinación del desarrollo embrionario

1. Se pre-calentó el microscopio colocando el calentador cerca de él por lo menos 15 minutos antes de uso.
2. Se determinó el índice de desarrollo embrionario por número de células (división celular) de los presuntos embriones puestos inicialmente en las microgotas. Se regresaron las placas a la incubadora.

Día 5 pos FIV- adición de suero (opcional)

1. Se puso el tubo eppendorf de suero fetal inactivado con calor (solución 24) en la incubadora 1-2 horas antes de agregarlo a las microgotas que contienen los embriones.
2. Se precalentó el aire colocando el calentador delante de la platina térmica.
3. Se colocaron las placas en la platina térmica y se agregaron 5 μ L de suero fetal bovino sometido a un tratamiento térmico filtrado estéril a cada microgota y regreso a la incubadora.

Días 7-9 pos FIV- evaluación final

1. Se precalentó el microscopio colocando el calentador cerca del microscopio por lo menos 15 minutos antes del uso.
2. Se determinaron el desarrollo de embriones y la etapa de blastocisto. Se regresaron las placas a la incubadora.
3. Se prepararon las pajuelas de embriones, tomando con la Drummond medio IVF-TALP, luego seleccionaron y tomaron el mejor embrión; finalizando con más medio Hepes-TALP.

Se determinaron las siguientes variables:

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

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statical Analysis System (SAS 2009), aplicando la prueba de Chi cuadrado, con una probabilidad exigida de $p \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número de oocitos recolectados por ovario. Las diferencias no fueron significativas entre los tratamientos ($p>0.05$) (Cuadro 11). La clasificación y la calidad de los oocitos fueron realizadas de acuerdo a lo sugerido por Leibfried y First 1980 (Anexo 2). Resultados similares han sido reportados por Vergos *et al.* (1990) y Lonergan *et al.* (1991) quienes obtuvieron 3.8 oocitos por ovario utilizando la técnica de punción folicular. De acuerdo a Loos *et al.* (1992) clasificaron por escala, evaluando la cantidad de capas de Células del Cúmulo *Oophorus* (CCO) y las características de homogeneidad del citoplasma y obtuvieron de 0.73 CCO/ovario hasta 2.2 CCO/ovario. Ohashi *et al.* (2002) y Huang *et al.* (2008) reportaron que el número de oocitos utilizables por ovario es de 3.18-2.8, por otra parte Leal *et al.* (2010) reportaron que con la técnica de punción folicular obtuvieron 18.6% de oocitos degenerados, similar a los resultados obtenidos en esta investigación (Figura 1).

Cuadro 11. Porcentaje de oocitos recolectados.

Tratamiento	Ovarios aspirados	Oocitos recolectados	Oocitos viables	Oocitos degenerados	Oocitos/ovario
Medio CR1aa.	100	473	363 (76.7%)	110 (23.3%)	3.6
Medio SOF	70	309	250 (80.9%)	59 (19.1%)	3.6
P					0.5686

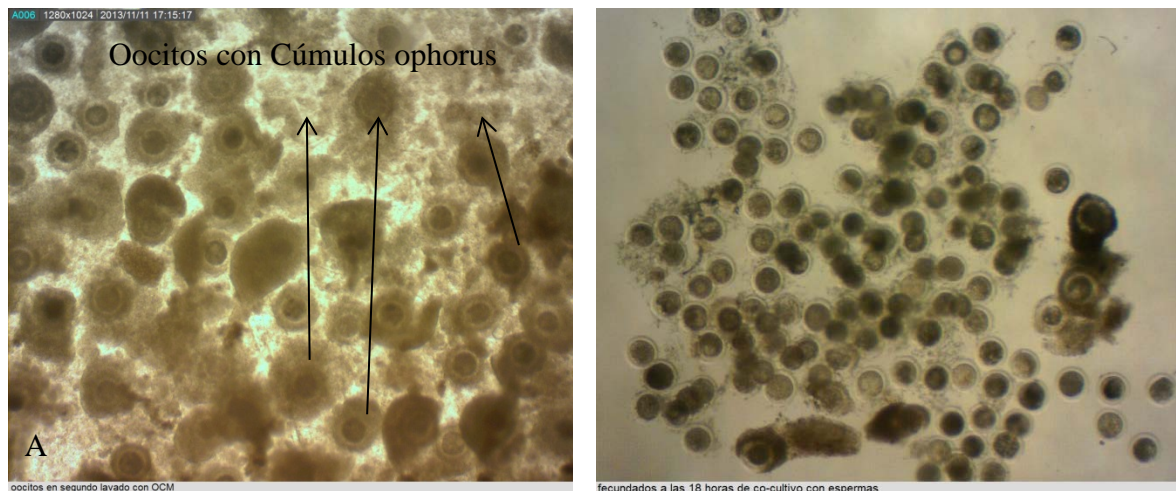


Figura 1. Oocitos recolectados: A) oocitos con CCO, B) oocitos desnudos.

Porcentaje de maduración *in vitro*. Para los medio CR1aa y SOF se encontró diferencia significativa en la cantidad de oocitos madurados ($p \leq 0.05$) (Cuadro12, Figura 2). Aguirre *et al.* (2009) quienes reportaron tasas de maduración *in vitro* para oocitos bovinos de 89.7% (1.308 oocitos madurados/1.458 oocitos recolectados) utilizando un medio de maduración suplementado con suero de novilla, gentamicina, folltropin, estradiol, piruvato de sodio y glutamina siendo estos resultados similares a las obtenidos con el medio de cultivo SOF de este estudio; sin embargo, Fernández *et al.*(1999) reportaron en estudios similares tasas de maduración de 70% de los oocitos en medio de maduración TCM-199 similares a las obtenidas con CR1aa. Robledo *et al.* (2009) compararon el medio TMC-199 y HECM-9, obteniendo 73.3% vs 71.4%, respectivamente. De igual forma, Navarro *et al* (2006) compararon los mismos medios de maduración obteniendo 65% para el medio HECM-9 y de 71% para el TCM-99 sin encontrar diferencias significativas entre ambos.

Cuadro 12. Porcentaje de maduración de oocitos.

Tratamiento	Oocitos recolectados	Oocitos madurados	Oocitos no madurados
Medio CR1aa.	363	280 (77.1%) ^a	83 (22.9%) ^a
Medio SOF	250	213 (85.2%) ^b	37 (14.8%) ^b
P		0.0134	

a-b Promedios en la misma columna con letras distintas difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

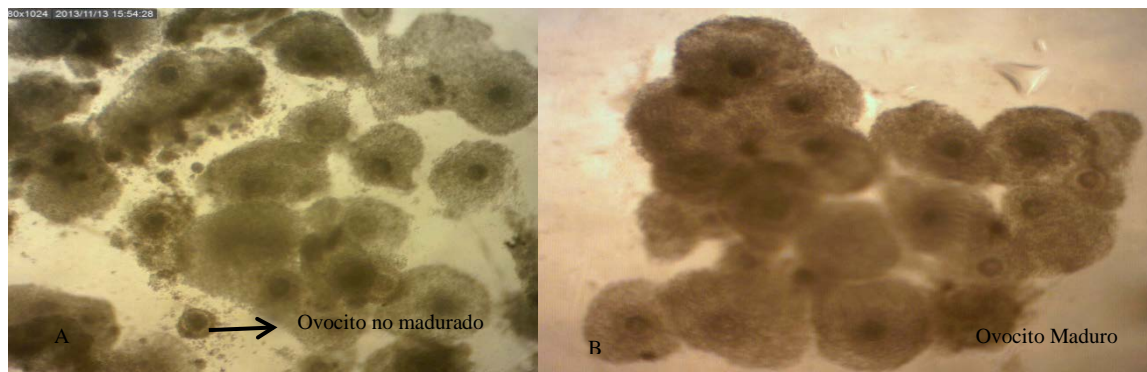


Figura 2. Oocitos en medio de maduración. A) oocitos no madurados B) oocitos maduros.

Porcentaje de oocitos fertilizados. Para la tasa de fertilización se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para los medios de cultivo CR1aa y SOF en la tasa de oocitos fertilizados, lo que se refleja en el Cuadro 13 (Figura 3). Fernández *et al.* (1999) reportaron tasas de fertilización del 70% en el grupo de oocitos madurados en medios con GnRH similares a los reportados con el medio de cultivo SOF en este estudio. Años anteriores Schellander *et al.* (1990) reportaron tasas de fertilización 78% utilizando medio TMC-199 suplementado con SFB, LH y estradiol; Leibfried *et al.* (1980) realizaron experimentos donde comparaban la fertilización de oocitos madurados *in vivo* vs la *in vitro* de la cual obtuvieron 86% para los oocitos madurados *in vivo* y 70.4% para los oocitos madurados *in vitro*; Shioya *et al.* (1988) realizaron experimentos quitando una parte de las capas de Células de Cúmulos (CCO) comparándola con oocitos que tuvieran sus capas completas, obteniendo 85.8% para los oocitos con sus capas incompletas. Coskum *et al.* (1991) reportaron tasas de fecundación de 58% utilizando medios de maduración suplementado con 50 ng/mL de EGF.

Cuadro 13. Porcentaje de oocitos fertilizados.

Tratamiento	Oocitos Madurados	Oocitos Fertilizados	Oocitos no Fertilizados
Medio CR1aa.	280	144 (51.4%) ^a	136 (48.6%) ^a
Medio SOF	213	148 (69.5%) ^b	65 (30.5%) ^b
P		<0.0001	

a-b Promedios en la misma columna con letras distintas difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

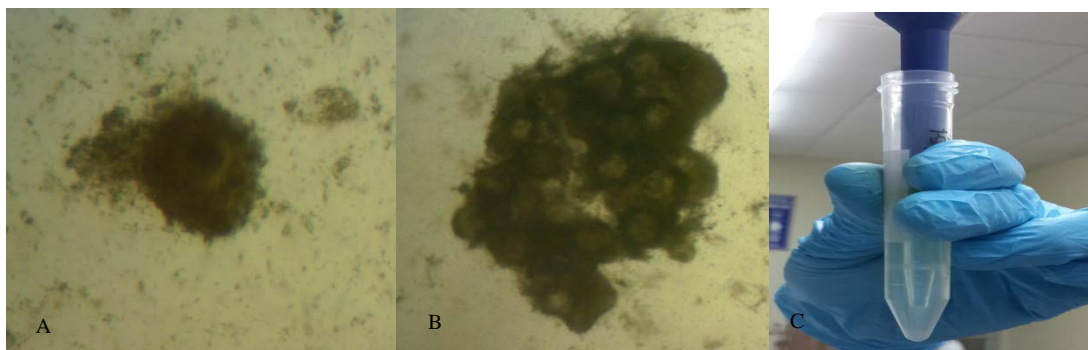


Figura 3. Oocitos fecundados A) oocito con células del cúmulo expandidas, B) oocitos fertilizados, C) pellet de espermatozoides.

Porcentaje de oocitos en clivaje y apoptosis. Clivaje es la segmentación del cigoto, estas divisiones se conocen como blastómeros, que forman una masa compactada llamada mórula, que forma la blástula hasta que llega a ser gástrula; la apoptosis es la muerte celular programada provocadas por ellas mismas. Se encontraron diferencias significativas para las variables oocitos clivados y oocitos en apoptosis ($p \leq 0.05$), como se puede observar en el Cuadro 14 (Figura 4). Vicente *et al.* (2009) compararon dos medios de cultivos, CR1aa y KSOMaa en los cuales obtuvieron 44% para la tasa de clivaje del CR1aa y 83% para KSOMaa encontrando diferencias significativas entre ambos medios de cultivos, se obtuvo tasas mayores a las reportadas con el medio de cultivo CR1aa en este protocolo; Bosh *et al.* (2006) realizaron estudios en caprinos comparando el medio de cultivo MC y SOF, obteniendo mejores tasas de clivaje con SOF 75% a diferencia del MC 41%. Fernández *et al.* (2007) reportaron que de 544 oocitos fertilizaron 191(35.1%), de los cuales el 13.6% alcanzó la etapa de mórula y el 1.6% llegaron a la etapa de blastocitos viables. Rrato *et al.* (1999) obtuvieron a los dos días post inseminación embriones de 4 a 8 células en promedio de 62.7%, el porcentaje para el desarrollo de mórulas fue de 17.6% y obtuvieron una tasa de 15.75% de blastocitos para cigotos cultivados con células oviductuales.

Cuadro 14. Porcentaje de oocitos en clivaje y oocitos en apoptosis.

Tratamiento	Oocitos Fertilizados	Oocitos en Clivaje	Oocitos en Apoptosis
Medio CR1aa.	144	89 (61.8%) ^a	55 (38.2%) ^a
Medio SOF	87	41 (47.1%) ^b	46 (52.9%) ^b
P		0.0293	

a-b Promedios en la misma columna con letras distintas difieren entre sí ($P \leq 0.05$)



Figura 4. Embriones en apoptosis.

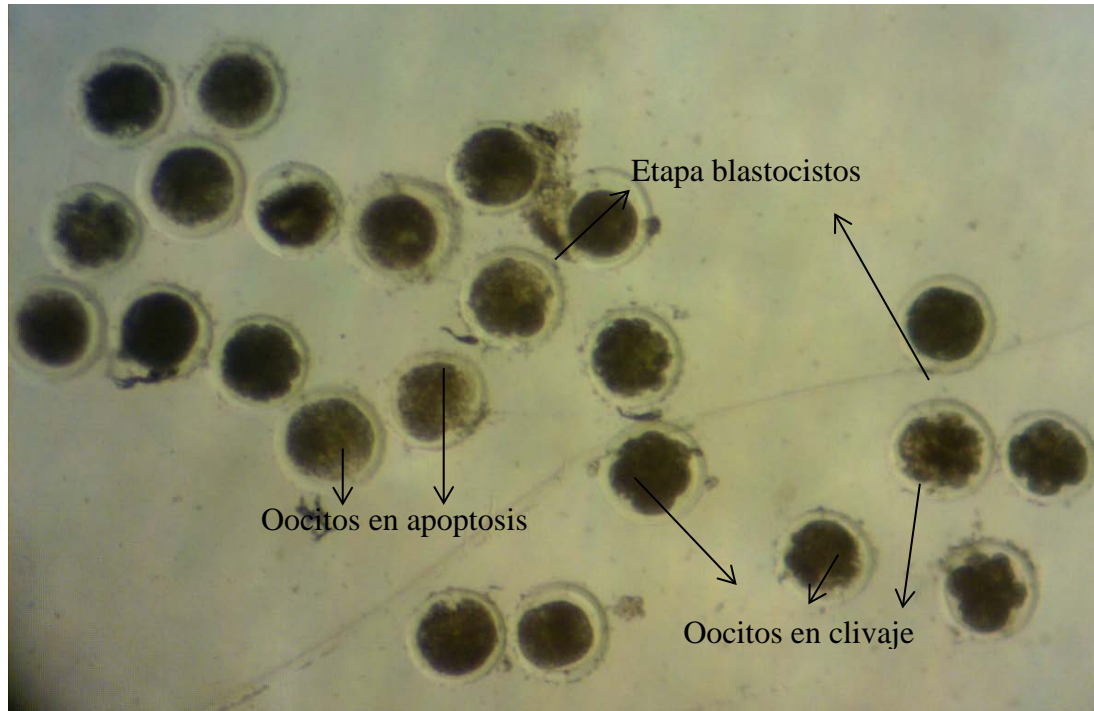


Figura 5. Oocitos en clivaje, apoptosis y en etapa de blastocistos

Porcentaje de embriones obtenidos. Para los medios de cultivos CR1aa y SOF se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), para la variable de embriones obtenidos (Cuadro 15; Figura 6). Siendo estos similares a los reportados por Fernández *et al.* (2007) quienes realizaron investigaciones a partir de 544 oocitos y obtuvieron 191 (35.15%) que alcanzaron la división embrionaria, de estos el 73.65% llegaron a la etapa de mórula y 1.6% llegaron a la etapa de blastocistos viables para ser transferidos; Fernández *et al.* (2010) reportaron que no existió diferencias significativas utilizando el método de punción folicular y por cortes, obtuvieron tasas de 11.8% y 11.2% respectivamente de los oocitos en clivaje, siendo estos resultados inferiores a los de este estudio; Abeydeera (2002) utilizando el método de punción para la recolección de los oocitos obtuvo 38% de embriones; Gutiérrez *et al.* (2001) señalaron que de estos embriones producidos solo el 5 al 20% llegan a producir gestaciones.

Cuadro 15. Porcentaje de embriones obtenidos con medio CR1aa y SOF.

Tratamiento	Oocitos en clivaje	Embriones obtenidos
Medio CR1aa.	89	39 (43.8%) ^a
Medio SOF	41	32 (78.0%) ^b
P		0.0003

a-b Promedios en la misma columna con letras distintas difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

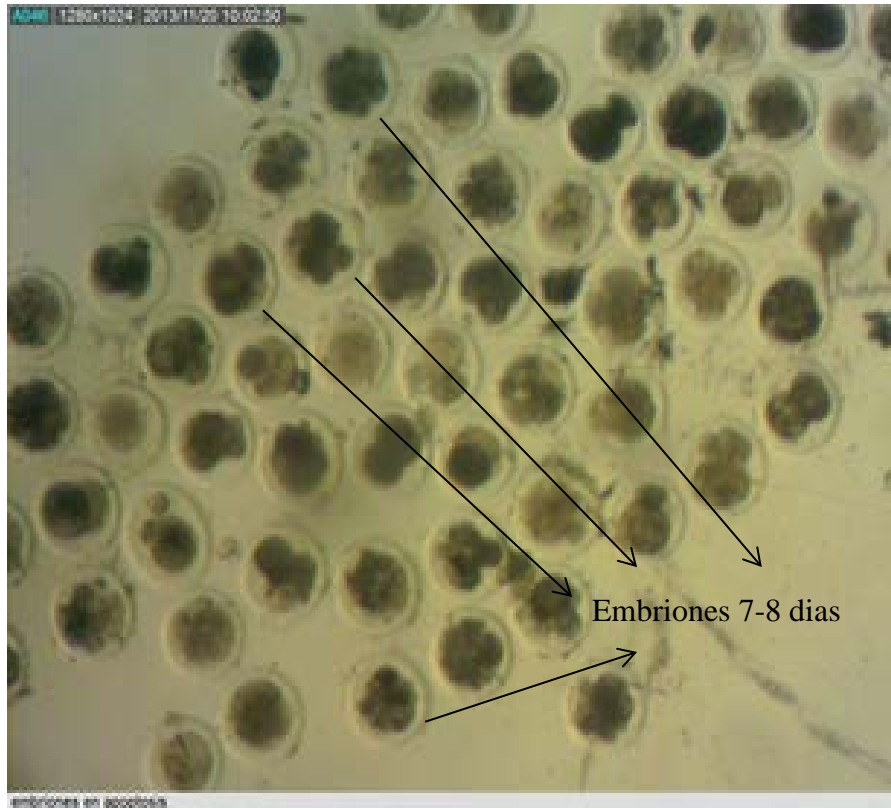


Figura 6. Embriones día 7-8 en diferentes estadios.

En el Cuadro 16 se presenta la eficiencia (%) de cada una de las etapas del proceso de FIV de acuerdo al número de embriones obtenidos en cada medio.

Cuadro 16. Eficiencia de cada etapa del proceso de FIV en relación al número de embriones obtenidos de cada medio.

Tratamiento	Oocitos viables/embriones	Oocitos maduros/embriones	Oocitos fertilizados/embriones	Oocitos clivaje/embriones
Medio				
CR1aa	10.7% ^a	13.9% ^a	27.0%	44.8% ^a
Medio SOF	22.8% ^b	27.5% ^b	36.7%	78.0% ^b
P	0.0005	0.0013	0.1216	0.0003

a-b Promedios en la misma columna con letras distintas difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

4. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de este estudio, los mayores porcentajes de maduración y fertilización de oocitos se obtuvieron con el medio SOF.
- El mayor porcentaje de clivaje y el menor porcentaje de apoptosis se obtuvo con el medio CR1aa.
- El mayor porcentaje de embriones obtenidos a los 7 días de cultivo se logró con el medio SOF.
- La mayor eficiencia en las relaciones oocitos viables/embriones, oocitos madurados/embriones, oocitos en clivaje/embriones se obtuvo con el protocolo de FIV utilizando el medio SOF.

5. RECOMENDACIONES

- Bajo las condiciones de este estudio se recomienda utilizar el medio de cultivo SOF, para los trabajos de FIV en el laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano.
- Comparar el medio de cultivo SOF con otros medios de cultivos como el KSOMaa, HTF, CR2,, CZB,USU,Ham F-10 y Menezo B.
- Realizar futuras investigaciones con un mayor número de repeticiones.

6. LITERATURA CITADA

Abeydeera L. 2002. *In vitro* production of embryos in swine. *Theriogenology*. 57:257-273.

Aguirre C, F. Montiel, P. Pérez, J. Gallegos. 2009. Medios alternativos para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia tropical*. 27(3):14 p.

Bosh P, M. Blanch, S. Ferrero, H. Díaz, F. Piccato. 2006. Desarrollo de embriones caprinos *in vitro*: efecto del Co-Cultivo con células epiteliales de oviducto. *Revista Científica Maracaibo*. 16(3):273-281.

Cáceres, R. 2011. Manual de prácticas de biología de la reproducción. Ciudad de Juárez Chihuahua. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. 96 p.

Cavestany D. 1985. Serie de Reproducción Animal "Post Parto en la Hembra Bovina". Montevideo Uruguay, Publicaciones Misceláneas. 98 p.

Coskum S, A. Sanbuissho, Y. Rikihisa. 1991. Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocyte mature ion medium containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology*. 36:488-494.

De Loos FAM, M. Jeuken, E. Zeinstra, M. Bevers. 1992. Structural aspect of bovine maturation *in vitro*. *Mol Reproduction*. 31:208-214.

Derivaux, J. 1961. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los animales domésticos. Trad. José Gómez Piquer. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA. 416 p.

Fernandez A, P. Bastidas, J. Troconiz. 1999. Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú *postmortem*. Post grado de reproducción animal y tecnología de la inseminación artificial. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 40(2):89-100.

Fernández A, T. Días, G. Muños. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista de la facultad de Ciencias Veterinarias*. Venezuela. 48(1):80.

Fernández F, J. Hernández, M. Reyes. 2010. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte de folículos. *Salud Animal*. La Habana. 32(2):32-35.

Gutiérrez A, A. Lonergan, P. Rizos, D. Ward, F. de la Fuente. 2001. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryo. *Theriogenology*. 55:1117-1126.

Hafez, E.S, B. Hafez. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Trad. Guillermina Féher de la Torre y Elia Olvera. Baja California, México. Editorial McGraw Hill. 519 p.

Hansen J. Universidad de Florida, 2000. Manual de recomendaciones para un trabajo de éxito en la producción de embriones *in vitro* (tips). Department of Animal Sciences Dairy Research.

Huang F, C. Pang, X. Zhang. 2008. *In vitro* fertilization and subsequent embryo development using oocytes derived from abattoir ovaries in different seasons in buffalo. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*. 35:76-78.

Leal L, C. Moya, C. Fernandez, L. Martins, F. Landim, E Oba. 2010. Evaluation of recovery, quality and *in vitro* nuclear maturation of oocytes obtained from buffalo and bovine ovaries. *Revista Veterinaria*. 21(1):892.

Leibfried M, N. First. 1980. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes *in vitro*. *Theriogenology*. 23:699-704

Lonergan P, H. Sharif, P. Monagan, H. Wahid, A. Gallagher, I. Gordon. 1991. The effect of recovery method on the types of follicular oocytes obtained for *in vitro* maturation. *Theriogenology*. 35(1):231.

Mejia, V. 2009. Evaluación de dos métodos de cultivo sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista CEC, Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 4 (2):39-46.

Navarro M, R. Ducolomb, R. Galindo, G. Rosado. 2006. Sheep oocyte matured in a simplex medium (HECM-9), an answer to *in vitro* fertilization. *Fertility and development* 18:275-276.

Ohashi O.M, M.S. Miranda, J.K. Dantas, S.S. Santos, J.S. Sousa. 2002. La transferencia de embriones y la fertilización *in vitro* en el programa de búfalos en la Amazonía. *America Buffalos*. Belém. pp. 217-224.

Ratto M, M. Berland, M. Wolter, R. Matamoros. 1999. Desarrollo de embriones de bovino obtenido por fecundación *in vitro* cultivado con células oviductales o medio condicionado y transferido a hembras receptoras. *Valdivia*. Temuco, Chile. 31 (1)89-9

Robledo J, J. Herrera, M. Cajero, M. Navarro, A. García. 2009. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. *Tropical and subtropical Agroecosystems*. 10(1): 95-99.

Schellander K, F. Fuhrer, B. Brackett, H. Korb, W. Schleger. 1990. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology*. 33:477-385.

Shioya Y, M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Owasaki, A. Hanada. 1988. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. *Theriogenology*. 30:389-496.

Sorensen, A.M. 1979. *Reproducción animal principios y prácticas*. Trad. Ramón Elizondo. Estados Unidos. Editorial McGraw Hill book Co., U.S.A. 539 p.

Vergos F, A. Kinis, P. Lonergan, H. Sharif, H. Gallagher, I. Gordon. 1990. Effect of recover method on the yield of embryos often *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicles oocyte. *Reproduction Fertility*. 6:68.

Vicente I, S. Arango, A. López, O. Camargo. 2009. Evaluación de dos medios de cultivo sobre la producción *in vitro* en embriones bovinos. *Medicina Veterinaria y Zootecnia* 4(2):39-46.

7. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de los medios stock.

Solución 1: Lactato de Sodio. Comprar a 98% SIGMA. Seguir las indicaciones del fabricante para la fecha de vencimiento. Almacenar a 4°C.

Solución 2: Piruvato de Sodio. Disolver 0.220 g de piruvato de sodio en 100 mL de agua. Esterilizar, filtrar y envolver la botella de 100 ml en aluminio, para proteger de la luz conservar a 4°C por 1 mes.

Solución 3: Suero de novillo (bovino) (BSS). Preparar 10 mL de BSS en tubos estériles de 13 mL y almacenarlas a -20 °C indefinidamente.

Solución 4: BSS/Hep. Agregar 1000 unidades USP de heparina estéril (disolver en 3-5 mL de agua y esterilizar a través de un filtro utilizando una jeringuilla) agregar a 500 mL de BSS (Solución 3). Almacenar 8 ml en tubos estériles de 13 mL indefinidamente a -20 °C.

Solución 5: Estradiol. Disolver el estradiol de 1 a 3 mg en etanol para una concentración final de 1 mg/mL. Almacenar en un envase de cristal a -20°C por hasta 2 meses.

Solución 6: Folltropin. Reconstituir Folltropin-V según lo recomendado por el fabricante para preparar 20 µg/µL de solución. Poner 150 µL en tubos estériles de microcentrífuga de 1.5 mL y almacenarlas indefinidamente a -20°C.

Solución 7: Heparina. Disolver 20 mg en 10 ml de agua. Medir con una pipeta las soluciones de 300 µLy almacenarlas a -20°C en tubos del microcentrífuga de 1.5 mL indefinidamente.

Solución 8: Gentamicina. Diluir a 5 mg/mL, concentración en agua filtrar esterilizar. Medir con una pipeta poner de 1 ml en tubos estériles de 4 mL y almacenarlas a -20°C indefinidamente.

Solución 8A: Gentamicina. Al preparar la solución 8, preparar algunos tubos adicionales de solución de 10 µL en tubos estériles de microcentrífuga y almacenarlos a -20°C indefinidamente.

Solución 9: Mezcla de PHE. Prepare solución primaria de 1 mL de hipotaurina (1.09 mg en 10 mL de solución salina), 2 mL penicilamina (3 mg en 10 mL de solución

salina) y 250 μ L de hepinefrina [disolver 1.83 mg en 40 mL de una solución de lactato-Metabisulfito (9A). La hepinefrina se oxida fácilmente, tener precaución de proteger el procedimiento de la luz directa, cubrir con papel aluminio en envase o utilizar un envase oscuro). Combinar los 10 mL de hipotaurina, 10 mL de penicilamina y 4 mL de hepinefrina, con 16 mL de solución salina y esterilice filtrando. Forme soluciones de 400 μ L de mezcla de PHE en tubos estériles de microcentrifuga de 1.5 mL y almacene en un envase resistente y protegido de la luz (oscuro u opaco) a temperatura de -20°C indefinidamente. Sobre la manipulación de la mezcla de PHE para su uso, cubra el tubo con papel aluminio mientras se utiliza.

Solución 9A: Solución Lactato - Metabisulfito. Agregar 77 μ L de una solución de lactato del Sodio al 98% (o del volumen equivalente si se utiliza una solución con un porcentaje más bajo del lactato de Sodio) y 50 mg de Metabisulfito de Sodio a 50 mL de agua. Hacer para cada uso.

Solución 10: Glutamina (1mL). Preparar la solución común 1.5 g de glutamina/100 mL de agua, filtrar esterilizar y hacer las soluciones de 1 mL en tubos estériles de 4 mL y almacenarlas a -20°C indefinidamente.

Solución 11: Glutamina (4 mL). Preparar la solución común 1.5 g de glutamina/100 mL de agua, filtrar esterilizar y almacenar 4 mL en tubos de 13 mL a -20°C indefinidamente.

Solución 12: MgCl_2 para Percoll. Prepare la solución de 0.1 M agregando 0.203 g de MgCl_2 a 10 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4°C indefinidamente.

Solución 13: CaCl_2 para Percoll. Preparar la solución de 1 M agregando 0.735 g $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ a 5 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4°C indefinidamente.

Solución 14: Hyaluronidasa. Preparar la solución común de hyaluronidasa tipo IV en 10.000 unidades/mL de solución salina, esterilizarla a través de un filtro de 0.2 μ en un tubo estéril, y almacenar 100 μ L en tubos estériles de microcentrifuga a -20°C indefinidamente.

Solución 15: Penicilina/Estreptomicina (4 mL). Descongele la botella de 100 mL de penicilina/Estreptomicina y forme soluciones de 4 mL en tubos estériles de 5 mL y almacénense a -20°C indefinidamente.

Solución 16: Penicilina/Estreptomicina (10 mL). Descongele la botella de 100 mL de Penicilina/Estreptomicina haga soluciones de 10 mL en tubos estériles de 13 mL consérvelos a -20°C indefinidamente.

Soluciones 17-23 (preparar solamente si hacen sus propios medios del TL)

Solución 17: NaCl. Disolver 6.665 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4°C .

Solución 18: KCl. Disolver 0.588 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril en 4°C .

Solución 19: NaHCO₃. Disolver 1.052 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4°C para una semana solamente.

Solución 20: PO₄. Disolver 0.235 g NaH₂PO₄+H₂O en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4°C.

Solución 21: 1 M HEPES. Agregar 119 g de HEPES a 400 mL de agua. Ajustar el pH a 7.0 y ajustar el volumen hasta 500 mL. En un envase estéril filtrar y cubrir con el papel de aluminio; almacenar a 4°C indefinidamente.

Solución 22: CaCl₂ para TL. Disolver 1.470 g CaCl₂+2H₂O en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estériles a 4°C.

Solución 23: MgCl₂ para el TL. Disolver 1.017 g MgCl₂+ 6H₂O en 50 mL de agua. Filtrar/almacenar estéril a 4°C.

Solución 24: Suero Fetal Bovino. Preparar soluciones de 100 µL de Suero Fetal Bovino inactivado por calor, en tubos estériles de microcentrífuga y almacenarlas a -20°C.

Solución 25: Glutamax. Disolver 0.434 g de ALA-Gln en 20 mL de agua Sigma y esterilizar filtrando a 0.22 µm. hacer alícuotas de 600 µL en tubos eppendorf estériles y guardar a -20 C indefinidamente.

Anexo 2: Clasificación de los oocitos bovinos (Leibfried y First 1979)

Características	Descripción	Categoría
Células Circundantes	Cúmulos oophorus presente y completo, más de tres capas compactadas	1
Ooplasma	Finamente granular, dando al oocito una apariencia grisácea y una zona pelúcida íntegra	1
Células Circundantes	Células de Cúmulo oophorus rodeando parcialmente al ovocito más de dos capas compactas	2
Ooplasma	Se encuentran algunos cuerpos pigmentados y la zona pelúcida presenta imperfecciones	2
Células Circundantes	La célula del cumulus está presentes pero expandidas	3
Ooplasma	Existen vacuolas y la zona pelúcida carece de integridad	3
Células Circundantes	No hay presencia de células, el oocito está rodeado por la zona pelúcida solamente	4
Ooplasma	Citoplasma pigmentado o contraído	4