

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
**Efecto de la suplementación con el Factor de Crecimiento Epidérmico EGF en
el medio de maduración sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos**

Presentado por
María José Flores Marroquín
María Celeste Reyes Archaga

Asesores
John Jairo Hincapié, D.Sc.
Rogel Castillo, M.Sc.

Honduras, junio 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA ODILA TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos	12
Localización	12
Recolección de Ovarios (día -1).....	12
Acondicionamiento de los Ovarios (día -1).....	12
Aspiración Folicular y Obtención de los Ovocitos (día -1)	13
Fertilización <i>in vitro</i> (FIV) (día 0)	16
Metodología para Preparar el Gradiente de Percoll 45-90%.....	17
Descongelación del Semen	18
Cultivo <i>in vitro</i> (día 1).....	18
Desempaque/Denudación (Eliminar las Células del <i>cumulus oophorus</i>).....	19
Tratamientos.....	19
VARIABLES ANALIZADAS	20
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	20
Resultados y Discusión.....	21
Recolección de Oocitos.....	21
Porcentaje de Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	22
Porcentaje de Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	23
Porcentaje de Clivaje	24
Porcentaje de Mórulas y Blastocistos	26

Eficiencia General	28
Conclusiones	29
Recomendaciones.....	30
Referencias.....	31
Anexos.....	34

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Protocolo para la preparación del Medio de Colección de Ovocitos (MCO)	13
Cuadro 2 Protocolo para la preparación de la solución madre del Medio de Maduración de Ovocitos (MMO) TCM-199 Parker (MPM stock).....	13
Cuadro 3 Protocolo para la preparación de la solución madre para obtener la formulación final del medio TCM-199 Parker	14
Cuadro 4 Protocolo para la preparación del medio de capacitación y acondicionamiento	16
Cuadro 5 Protocolo para la preparación del medio 10X SP-TL para Percoll 90%	16
Cuadro 6 Protocolo para la preparación del Percoll 90%	16
Cuadro 7 Protocolo para la preparación del Percoll 45%	17
Cuadro 8 Protocolo para la preparación del medio de fertilización (FIV)	17
Cuadro 9 Protocolo para la preparación del medio de cultivo SOF (Fluido Sintético de Oviducto)....	18
Cuadro 10 Valores porcentuales de ovocitos madurados in vitro para los tratamientos con EGF y control.....	23
Cuadro 11 Valores porcentuales de ovocitos fertilizados, ovocitos en clivaje y apoptosis al tercer día para los tratamientos con EGF y control.....	25
Cuadro 12 Valores porcentuales de embriones y su categoría para los tratamientos con EGF y control	28
Cuadro 13 Eficiencia del procedimiento del FIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje utilizando EGF	28

Índice de Figuras

Figura 4 Clivaje al día 3 tratamiento control.....	24
Figura 5 Mórula temprana obtenida a partir de la suplementación con EGF.	26
Figura 6 Blastocistos provenientes de la suplementación con EGF.....	27
Figura 7 Blastocistos obtenidos en el día 7 tratamiento control	27
Figura 8 Blastocisto expandido en el tratamiento con EGF	27

Índice de Anexos

Anexo A Preparación de medios.....	34
Anexo B Aspiración folicular mediante el método de punción.	35
Anexo C Materiales utilizados.....	36
Anexo D Procedimiento de sotoposición.....	37
Anexo E Incubadoras equilibradas.....	38
Anexo F Microgotas flotantes para maduración in vitro.	39

Resumen

El factor de crecimiento epidérmico EGF es una proteína que estimula el crecimiento y la proliferación celular en la maduración de oocitos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el porcentaje de maduración *in vitro* suplementado con un factor de crecimiento epidérmico. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de reproducción animal de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Se utilizaron los medios de colección de ovocitos (MCO) y medios de maduración de ovocitos (MMO TCM-199 Parker). Así mismo, se aspiraron un total de 111 ovarios provenientes de vacas faenadas de la planta de cárnicos de la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA). Posteriormente, se aspiraron 69 y 42 ovarios para los tratamientos control y EGF, respectivamente. Se acondicionaron los ovarios para realizar aspiración folicular y obtener los ovocitos. Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (MIV + EGF y MIV control). El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2). Se encontró diferencia ($P \leq 0.05$) para los tratamientos con EGF y tratamiento control para las variables de maduración *in vitro* (90.41 vs 79.04%), fertilización *in vitro* (84.85 vs 74.59%), blastocistos (73.80 vs 54.35%), mórulas (26.42 vs 45.65%), respectivamente; caso contrario para las variables clivaje (81.25 vs 77.78%), apoptosis (18.75 vs 22.22%) no se encontró diferencia ($P > 0.05$); el tratamiento con EGF fue el que obtuvo la mejor eficiencia en todo el proceso de PIV.

Palabras clave: Embriones, factor de crecimiento, folículo ovárico.

Abstract

Epidermal growth factor EGF is a protein that stimulates cell growth and proliferation in oocyte maturation. The objective of this research was to evaluate the percentage of maturation *in vitro* supplemented with epidermal growth factor. The study was carried out in the facilities of the animal reproduction laboratory of the Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Oocyte collection media (OCM) and oocyte maturation media (OMM) were used. A total of 111 ovaries from cows slaughtered at the meat plant of Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA) were aspirated. Subsequently, 69 and 42 ovaries were aspirated for the control and EGF treatments, respectively. The ovaries were conditioned to perform follicular aspiration and obtain the oocytes. A Completely Randomized Design (CRD) with two treatments (IVM + EGF and IVM control) was used. Data analysis was performed using the Chi-Square Frequency Distribution test (χ^2). Difference ($P \leq 0.05$) was found for the EGF treatments and control treatment for the variables of *in vitro* maturation (90.41 vs 79.04%), *in vitro* fertilization (84.85 vs 74.59%), blastocysts (73.80 vs 54.35%), morulae (26.42 vs 45.65%), respectively; contrary case for the variables cleavage (81.25 vs 77.78%), apoptosis (18.75 vs 22.22%) no differences were found ($P > 0.05$); EGF treatment was the one that obtained the best efficiency in the whole IVP process.

Keywords: Embryos, epidermal growth factor, ovarian follicle.

Introducción

En las últimas décadas, la biotecnología ha sido un gran impulso para efficientizar procesos con herramientas capaces de manipular, optimizar y modificar la producción *in vitro* de embriones bovinos con el fin de mejorar la reproducción alcanzando un mejoramiento genético en el ganado y garantizando altas tasas de preñez. Dicho proceso de producción *in vitro* de embriones bovinos es secuencial y consta de: maduración de ovocitos, fecundación y cultivo de embriones, siendo la maduración *in vitro* en el que los gametos femeninos consiguen las facultades para ser fecundados y finalizan el desarrollo, logrando su competencia citoplasmática y genética. Esta técnica se ha convertido en una de las tecnologías de mayor desarrollo que incorpora la comprobación de distintos mecanismos de maduración e interrelación de los gametos femeninos y masculinos en un ambiente adulterado (Palomino 2019). La fecundación *in vitro* (FIV) emplea medios de cultivos enriquecidos, que proveen un ambiente simulado al ovocito maduro y a los espermatozoides, donde pueda darse el proceso de la penetración espermática (Goicochea Vargas et al. 2021). En cambio, el éxito de la técnica se verifica al producir individuos vivos procedentes de FIV, empleando tanto ovocitos madurados *in vivo* o madurados *in vitro*, aunque la eficiencia de estas fases es menor a la fecundación natural (Cabrera et al. 2012).

Con condiciones ideales, se puede llegar a un 95% de maduración en los ovocitos; sin embargo, los factores como el medio de cultivo y los suplementos utilizados pueden afectar negativamente este proceso (Salgado-Cruz y Lopera Vasquez 2020). Las diversas técnicas de fertilización *in vitro* tienen como propósito la extracción del contenido de los folículos y conseguir gametos inmaduros, es decir los complejos cúmulo-ovocito (CCO) (Sutton et al. 2003). El proceso de maduración del ovocito es regulado por señales situadas en el líquido folicular, dichas señales también son capaz de regular procesos de la división celular y diferenciación. Seguido al proceso de maduración *in vitro*, los complejos cúmulo-ovocito se encargan de realizar la fecundación al momento de realizar la unión con los espermatozoides (Parrish 2014). En la fertilización *in vitro* se desarrollan diversos procesos fisiológicos, los cuales consisten en la capacitación y penetración de los espermatozoides,

unión de gametos y formación de pronúcleos, luego de pasar por un proceso de selección de espermatozoides motiles (Liu et al. 2013). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es una sustancia miogénica que promueve la proliferación y división celular. Por lo tanto, en este proyecto se utilizará como un suplemento y se evaluará su eficiencia en general. La familia de los EGF de los factores de crecimiento se ha visto que causan un incremento significativo en el desarrollo en los embriones bovinos de dos a ocho células, así como en el paso de mórula a blastocisto (Palasz y De la Fuente 2019). Existen varios factores de crecimiento los cuales son ideales para cumplir con el desarrollo de la proliferación celular del embrión, entre ellos se puede mencionar los asociados con la insulina (IGF), los de crecimiento transformador (TGF) y los epidérmicos (EGF) (Palasz y De la Fuente 2019). En el caso del factor de crecimiento epidérmico (EGF) es capaz de influenciar favoreciendo el proceso de maduración del oocito (Salgado-Otero et al. 2013). Para el cultivo de embriones es necesario retirar las células del *cumulus oophorus* adyacentes a los cigotos, siendo los cigotos de mejor condición y calidad los que son seleccionados para ser cultivados (Salgado-Cruz y Lopera Vasquez 2020).

El medio de cultivo es un aspecto muy importante para el desarrollo del embrión en este caso se utilizará el Fluido Sintético de Oviducto (SOF por sus siglas en inglés), cuya composición consiste en fluidos procedentes del oviducto bovino. Sin embargo, hay diferentes factores que pueden afectar los parámetros físicos del medio de cultivo, desde la luz que obtenga, hasta el volumen que alcance por la cantidad de embriones a utilizar. Con el factor de crecimiento EGF se determinará los diferentes porcentajes *in vitro* de maduración, fertilización y las tasas que se alcanzan en clivaje.

La presente investigación tuvo como finalidad: determinar los porcentajes *in vitro* de maduración y fertilización, así mismo evaluar el porcentaje de clivaje, embriones obtenidos (mórulas y blastocistos) y apoptosis. De la misma forma determinar la eficiencia de cada una de las etapas del proceso de producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos a partir de la suplementación con el Factor de Crecimiento Epidérmico EGF en el medio de maduración.

Materiales y Métodos

Localización

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana entre agosto/2021 y junio/2022. Las instalaciones se encuentran ubicadas a 32 km de Tegucigalpa, con un promedio de altura sobre el nivel del mar de 800 m, temperatura anual de 24 °C, y 1100 mm de precipitación.

Recolección de Ovarios (día -1)

Se utilizó ovarios procedentes de vacas faenadas en la planta de cárnicos de la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA), localizada a 5 km de las instalaciones del laboratorio. Todo el material que se utilizó fue previamente (cuatro horas antes) atemperado a 38 °C; las incubadoras fueron equilibradas una semana antes a fin de garantizar su buen funcionamiento y el equilibrio de gases correcto.

Para el transporte de los ovarios se utilizó solución salina fisiológica (SSF 0.9% NaCl) suplementada con 0.5 g/L y 100,000 UI/L de estreptomicina y penicilina, respectivamente. La solución se preparó mínimo dos horas antes y se atemperó a 35 °C. Una vez en la planta de faenado, los ovarios fueron colectados y depositados en el termo que contiene la solución de transporte. El tiempo entre la recolección y el inicio del proceso en el laboratorio no superó las seis horas.

Acondicionamiento de los Ovarios (día -1)

Este proceso se realizó en el laboratorio y consistió en eliminar todos los restos de tejidos como oviductos, grasa y cuernos uterinos. Posteriormente se lavaron en tres ocasiones en SSF 0.9% suplementada con antibióticos. Todo el proceso se realizó en soluciones atemperadas a 35 °C.

Aspiración Folicular y Obtención de los Ovocitos (día -1)

Los medios para la colecta de ovocitos (MCO) y para la maduración de ovocitos (MMO) fueron preparados cuatro horas antes de iniciar la maniobra de aspiración. Se utilizó microgotas flotantes de 100 μ L de MMO conservando una relación de 10 μ L/ovocito cubiertas con aceite mineral en placa Petri de 60 mm, y equilibradas en la incubadora a 20% O₂ y 5% CO₂, 38.5 °C por lo menos cuatro horas antes de realizar la maniobra de aspiración de ovocitos. Para el medio de colección de ovocitos se utilizó el medio Minitube® MCO 19990/0050 el cual se describe en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Protocolo para la preparación del Medio de Colección de Ovocitos (MCO).

Ingrediente	Cantidad
Solución madre Minitube® MCO 19990/0050 MCO	10 mL
Suero Albúmina Bovino EFAF	60 mg

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

EFAF: Libre de ácidos grasos.

Para el medio de MMO se utilizó el medio TCM-Parker, el cual se describe en el Cuadro 2 y 3.

Cuadro 2

Protocolo para la preparación de la solución madre del Medio de Maduración de Ovocitos (MMO)

TCM-199 Parker (MPM stock).

Ingrediente	Cantidad
TCM 199 10X	10 mL
HEPES	140 mg
Bicarbonato de sodio	300 mg
Piruvato de Sodio	25 mg
Gentamicina stock	110 mL
Lactato de calcio (disuelto en 10 ml de agua ultrapura)	60 mg
Rojo fenol	1 mg
Agua ultrapura	90 mL

Nota. Esterilizar por filtración a 0.22 μ m y almacenar a 4 °C máximo un mes.

El día de la maniobra de aspiración, se suplementó la solución madre como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3

Protocolo para la preparación de la solución madre para obtener la formulación final del medio TCM-199 Parker.

Ingrediente	Cantidad
MPM stock	8 mL
Suero de vaca en celo (SVC)	1 mL
Hormona folículo estimulante recombinante humana stock (FSH-rh)	100 μ L
Cisteamina	100 mM

Nota. MPM: Medio Parker de Maduración.

Se utilizó la comparación entre el medio de maduración de ovocitos (MMO) TCM-199 Parker y TCM-199 Parker suplementado con 10 ng/mL de EGF (Katchicualula 2011).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) de la glándula submaxilar murina se ha utilizado como mitógeno, provocando que la célula comience la mitosis, en una variedad de líneas celulares. En cultivos de tejidos, EGF actúa para reducir o eliminar el requerimiento de suero y puede usarse junto con otros aditivos de medios y hormonas. La concentración de trabajo para EGF es generalmente de 0.1 a 10 ng/mL.

EGF es mitogénico para una variedad de células epidérmicas y epiteliales, incluyendo fibroblastos, células gliales, células endoteliales vasculares y corneales, granulosa bovina, células HeLa, células SV40-3T3 y células epiteliales mamarias, condrocitos de conejo. El EGF también juega un papel biológico en la inhibición de la secreción de ácido gástrico, el apoyo del crecimiento durante el desarrollo fetal y la neuromodulación en el sistema nervioso central. La estimulación de los flujos iónicos, el transporte de glucosa, la glucólisis y la síntesis de ADN, ARN y proteínas son todos efectos metabólicos celulares del EGF.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un pequeño polipéptido mitógeno presente en una gran cantidad de tejidos y fluidos corporales en muchas especies de mamíferos. EGF es un miembro de una familia de factores de crecimiento caracterizada por seis categorías de cisteína conservados que forman tres enlaces disulfuro. El EGF humano es una molécula idéntica a la β -urogastrona, una molécula aislada sobre la base de su capacidad para inhibir la secreción de ácido

gástrico. El EGF es estructuralmente homólogo al factor de crecimiento transformante al humano, y ambos ejercen sus acciones a través de los receptores de EGF.

El EGF se liofiliza a partir de una solución en 1 mL de acetato de amonio 5 mM a pH 6.5; debe reconstituirse agregando el contenido del vial a una solución que contenga 0.1-1.0% de BSA o 1-10% de suero en solución salina tamponada o medio de cultivo de tejidos.

Se aspiraron los folículos con un diámetro aproximado entre 2 y 10 mm, utilizando jeringas de dos piezas y agujas 18 × 1½ pulgadas. El líquido folicular se depositó en un tubo de 50 mL de policarbonato estéril y atemperado en baño maría; terminado el proceso de aspiración, se dio un tiempo aproximado de 10 minutos para facilitar la decantación de los presuntos complejos *cumulus*-ovocitos (COC), una vez cumplido el tiempo estipulado se procedió a eliminar el sobrenadante cuidadosamente utilizando una pipeta Pasteur evitando crear turbulencia ya que esto puede representar la pérdida de ovocitos. Se eliminó el sobrenadante hasta que solo queden 5-7 mL de líquido folicular en el fondo el cual fue vaciado a una placa grid atemperada, se realizaron cuatro lavados del tubo con 5 mL de MCO a fin de recuperar posibles ovocitos que hayan quedado adheridos a las paredes del tubo.

A continuación, se procedió a la búsqueda, selección y clasificación de los ovocitos utilizando la lupa estereoscópica a 4× y la pipeta Drummond para la manipulación. Los ovocitos seleccionados fueron lavados tres veces en una placa Petri X que contiene 1000 µL de MCO y en el pozo cuatro 1000 µL de MMO. Solo se utilizaron ovocitos categoría I y II de acuerdo con la clasificación Minitube (s.f.) (más de tres filas de células del *cumulus oophorus*, zona pelúcida íntegra y citoplasma homogéneo y oscuro).

Los ovocitos seleccionados, fueron divididos aleatoriamente en los dos medios de maduración (TCM-199 Parker y TCM-199 Parker suplementado con EGF) y colocados a incubar durante 24 horas a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Fertilización *in vitro* (FIV) (día 0)

Para este proceso se utilizó el medio de capacitación y acondicionamiento Minitube® (Cuadro 4); para el desarrollo del proceso de Percoll 45-90% se utilizó los medios descritos en los Cuadros 5, 6 y 7.

Cuadro 4

Protocolo para la preparación del medio de capacitación y acondicionamiento.

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

Nota. *11 mg de Piruvato de sodio en 5 mL de DPBS (Dulbeccos PBS).

Esterilizar por filtración a 0.22 µm. Colocar 10 mL del medio en dos tubos de 15 mL; equilibrar durante dos horas en la incubadora a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Cuadro 5

Protocolo para la preparación del medio 10X SP-TL para Percoll 90%.

Ingrediente	Cantidad
Agua ultrapura	100 mL
NaCl	4.675 g
KCl	0.23 g
NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O	0.40 g
HEPES	2.38 g

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

Cuadro 6

Protocolo para la preparación del Percoll 90%.

Ingrediente	Cantidad
Solución 10X SP-TL	8 mL
Bicarbonato de sodio	0.168 g
Lactato de Sodio	180 µL
<i>Agitar suavemente hasta que el bicarbonato se disuelva completamente. Luego agregar:</i>	
Percoll	72 mL
MgCl ₂	316 µL
CaCl ₂	156 µL

Nota. Mezclar suavemente, ajustar pH a 7.3-7.45. Esterilizar por filtración en 0.45 µm. No debe formarse precipitado.

Colocar 3 mL de Percoll 90% en un tubo de 15 mL, equilibrar a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) cuatro horas antes de la maniobra de FIV.

Cuadro 7

Protocolo para la preparación del Percoll 45%.

Ingrediente	Cantidad
Solución medio de capacitación y acondicionamiento	3 mL
Percoll 90%	3 mL

Nota. Equilibrar 3 mL de Percoll 45% a 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%) cuatro horas antes de la FIV.

Como medio de fertilización *in vitro* se utilizó la solución madre de fertilización de Minitube®

(Cuadro 8).

Cuadro 8

Protocolo para la preparación del medio de fertilización (FIV).

Ingrediente	Cantidad
Solución stock Fertilización Minitube® 19990/0030	10 mL
Suero Albúmina Bovino EFAF	60 mg
Piruvato de sodio	100 µL
Heparina	200 µL

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

Una vez listo el medio de fertilización (Cuadro 8), se prepararon dos placas nunc colocando 600 µL de medio FIV en cada uno de los pozos sin aceite mineral y se llevaron a equilibrar cuatro horas antes en la incubadora 38 °C, 20% O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (95%).

Metodología para Preparar el Gradiente de Percoll 45-90%

Utilizando el procedimiento de sotoposición se depositaron muy lentamente los 3 mL de Percoll 90% en el fondo del tubo que contiene 3 mL de Percoll 45%, y se regresaron nuevamente a la incubadora. Este procedimiento se realizó una hora antes de iniciar la fertilización propiamente dicha.

Cumplidas las 24 horas de maduración, se retiraron las placas de maduración y los ovocitos madurados fueron lavados dos veces en medio FIV (utilizar placa Petri X) y depositados en las placas nunc de fertilización previamente preparadas para cada tratamiento y colocados nuevamente en la incubadora.

Descongelación del Semen

Se utilizaron tres pajuelas de tres diferentes toros: Holstein, Jersey y Pardo Suizo, ya que el utilizar el semen de tres toros diferentes, que no han sido probados para PIV, garantiza la viabilidad del semen para cada pozo de fertilización (Hansen 2013), las cuales se descongelaron en agua a 35 °C durante 40 segundos, posteriormente se procedió a secarlas y armar la pistola de inseminación, para depositar el semen lentamente sobre el gradiente de Percoll 45-90%; a continuación se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 1000 g en centrífuga atemperada a 38 °C, luego se retiró el pellet del fondo del tubo con una pipeta Pasteur y se depositó en el tubo previamente preparado con medio de acondicionamiento y se procedió a centrifugar atemperado a 200 g durante 10 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante suavemente dejando 0.5 mL que contenía el pellet.

Se procedió a realizar el cálculo de la concentración utilizando el espectrofotómetro Spermacue® y con base en el resultado se realizó el cálculo adicionando medio FIV a fin de fecundar cada pozo con 250,000 espermatozoides para una dosis fecundante calculada aproximada de 5,000 espermatozoides/ovocito. Realizado el cálculo se procedió a la fertilización (co-cultivo espermatozoides y ovocitos) durante 18 horas en la incubadora.

Cultivo *in vitro* (día 1)

Para el cultivo de los presuntos ovocitos fecundados (evaluación por inicio de clivaje y/o expulsión del segundo cuerpo polar), se utilizó el Fluido Sintético de Oviducto (SOF por sus siglas en inglés) el cual se describe en el Cuadro 9.

Cuadro 9

Protocolo para la preparación del medio de cultivo SOF (Fluido Sintético de Oviducto).

Ingrediente	Cantidad
Solución stock Medio de Cultivo SOF Minitube® 19990/0041*	10 mL
Suero de Vaca en Celo	1 mL
Aminoácidos esenciales	400 µL
Aminoácidos no esenciales	100 µL
Gentamicina	60 µL

Nota. Esterilizar por filtración a 0.22 µm.

Previo al inicio de la maniobra de cultivo, dos horas antes, se prepararon dos placas nunc (una para cada tratamiento) utilizando la metodología de microgotas flotantes de 100 μL cubiertas con aceite mineral y equilibrar a 5% de CO_2 , 5% de O_2 , 90% de N_2 y humedad relativa a saturación.

Desempaque/Denudación (Eliminar las Células del *cumulus oophorus*)

Este paso consiste en retirar las células del *cumulus oophorus* luego de cumplido el tiempo de fertilización, para lo cual los presuntos ovocitos fecundados (cigotos putativos) fueron colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 600 μL de SOF + 100 μL de Hialuronidasa atemperada (se utilizó un tubo para cada tratamiento), dejar sedimentar durante 5 minutos en la estufa a 38 °C, posteriormente se eliminó suavemente 400 μL del sobrenadante, llevándolo al vórtex durante tres minutos, tiempo al cual se depositó el contenido en una placa Petri X con gotas de 800 μL de SOF en los cuatro pozos y procedió al lavado y clasificación (ovocitos fecundados aquellos que presentan la expulsión del segundo cuerpo polar y/o han iniciado clivaje) a medida que se pasaron de un pozo a otro hasta completar cuatro lavados y luego se depositó en las microgotas flotantes de medio SOF (relación 1 ovocito:10 μL de SOF). Colocar nuevamente las placas en la incubadora a 5% de CO_2 , 5% de O_2 , 90% de N_2 y humedad relativa a saturación durante siete días.

Evaluación del cultivo:

72 horas: la tasa de división celular (clivaje) y suplementación con 10% de Suero Fetal Bovino (10 μL /gota). Fórmula [1]:

Día ocho: tasa de producción de mórulas y blastocistos:

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

Tratamientos

Se realizaron dos tratamientos:

Medio de Maduración *in vitro* suplementado con EGF (10 ng/mL)

Medio de Maduración *in vitro* sin suplementar (control)

Variables Analizadas

Se analizaron las siguientes variables:

Porcentaje de maduración *in vitro*

Porcentaje de fertilización *in vitro*

Porcentaje de clivaje (división celular)

Porcentaje de apoptosis (muerte celular)

Porcentaje de embriones obtenidos (mórulas-blastocistos)

Eficiencia general

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (MIV + EGF y MIV control) 174 y 264 ovocitos, respectivamente. El análisis de los datos se realizó con la prueba de Distribución de Frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) utilizando el programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS® 2012 versión 9.4), con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$.

Resultados y Discusión

Recolección de Oocitos

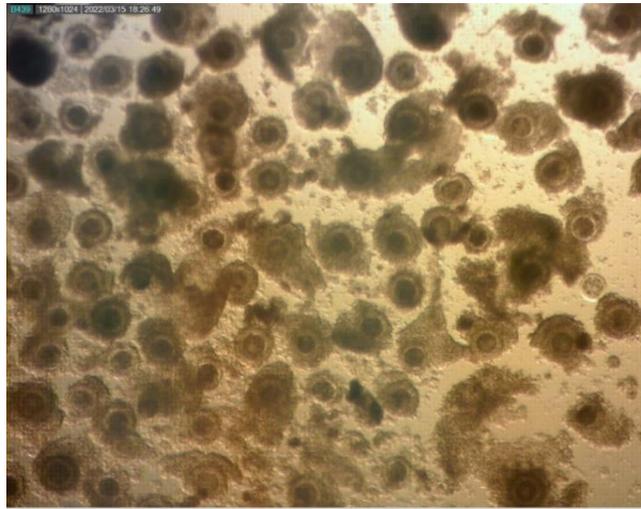
Los oocitos fueron recolectados de ovarios de vacas faenadas por el método de aspiración folicular mediante el uso jeringas. De esta manera se procesaron 111 ovarios dividiéndose de la siguiente manera 42 y 69 para tratamiento control y EGF, respectivamente. De estos se extrajo la cantidad de 438 oocitos, correspondiendo 174 para el tratamiento EGF, de los cuales 146 (83.90%) fueron viables y para el tratamiento control se aspiraron 264 oocitos, con 229 viables (86.74%).

Se considera que los ovocitos de ovarios de vacas faenadas presentan mayor capacidad de desarrollo para la producción *in vitro* de embriones bovinos, en comparación con los obtenidos por la técnica ovum pick-up (Quispe et al. 2018). La calidad de los oocitos está relacionada con el tamaño del folículo, estado reproductivo y fisiológico de las vacas donantes, ya que estos determinan el desarrollo eficiente de los tratamientos (Lonergan et al. 1994). Por otra parte, Merton et al. (2003) consideran que la manipulación de ovarios y el equipo utilizado influye en la producción de oocitos. Todo el material de este estudio fue preparado y esterilizado previo a la manipulación garantizando un ambiente seguro para la producción.

Los ovocitos viables se clasifican morfológicamente por tener un citoplasma homogéneo, coloración marrón, presentar la zona pelúcida intacta y las células del *cumulus oophorus* que lo rodean por completo (Krisner 2004). Se utilizó la escala de I a IV para clasificar los oocitos, siendo la categoría I los que presentan un mejor desarrollo oocitario (Gonella Diaz et al. 2013) (Figura 1).

Figura 1

Oocitos recolectados a partir de la aspiración folicular.

**Porcentaje de Maduración *in vitro* (MIV)**

Los resultados de este proyecto confirman la hipótesis planteada. La maduración *in vitro* es fundamental en la técnica de fecundación ya que de este proceso depende la fertilización y desarrollo del embrión. Las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre ambos tratamientos. Siendo el tratamiento EGF el que presentó un mayor porcentaje de ovocitos madurados superando al tratamiento control por un 11.37% (Cuadro 10). Según Mucci et al. (2006) este paso fundamental comprende una compleja serie de procesos fisiológicos que dictan si será exitoso o si será un fracaso los siguientes pasos, que son la fecundación de ovocitos maduros y cultivo embriones. Este periodo es en el que el ovocito reanuda la meiosis hasta el estadio de Metafase II. Se encontraron hallazgos similares en un estudio realizado por Salgado-Otero et al. (2013) en el cual suplementaron el medio con EGF, empleando una cantidad de 30 ng/mL, obteniendo un porcentaje de maduración de 97%.

Cuadro 10

Valores porcentuales de ovocitos madurados in vitro para los tratamientos con EGF y control.

Tratamiento	Ovocitos madurados (%)
EGF	90.41
Control	79.04
CV	9.6652
Probabilidad	0.0038

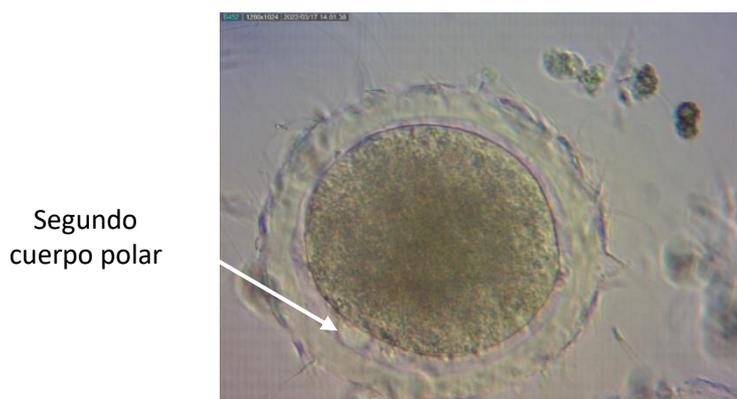
Nota. EGF= factor de crecimiento epidérmico; CV= coeficiente de variación.

Porcentaje de Fertilización *in vitro* (FIV)

Al momento en el que el espermatozoide traspasa la zona pelúcida del oocito ocurre la fertilización de estos. El porcentaje de ovocitos fertilizados en esta investigación presenta diferencias ($P \leq 0.05$) entre ambos tratamientos, siendo el tratamiento EGF el que muestra un mayor porcentaje de fertilización superando al tratamiento control por un 10.26% (Cuadro 11). Harper y Brackett (1993) en su investigación basada en la suplementación con factor de crecimiento epidérmico (EGF) demostraron que mejora la capacidad de desarrollo del oocito. En un estudio realizado por Rieger et al. (1998) reportaron que la adición de EGF en el medio provee un efecto benéfico, favoreciendo el crecimiento de las células del *cumulus* y su maduración ovocitaria.

Figura 2

Ovocito fecundado en el tratamiento suplementado con EGF.



Porcentaje de Clivaje

No hubo diferencias ($P > 0.05$) en los porcentajes de clivaje entre ambos tratamientos (Cuadro 11). La importancia del clivaje radica en que la división de las células contribuye con la creación de blastocistos (Hafez y Hafez 2000). Por otra parte, según Palomares Naveda et al. (2004) el EGF induce a una proliferación celular y desarrollo de blastocistos en medios químicamente definidos. En contraste con esta investigación en el cual se utilizó EGF en medios semidefinidos, se sustituyó el Suero Fetal Bovino por Suero Albúmina Bovino EFAF en el medio de fertilización ya que según Thompson (2000) la albúmina es una de las proteínas que tiene mayor presencia en el tracto reproductivo de los mamíferos y promueve la nutrición del embrión durante su desarrollo en las fases de post compactación. Sin embargo, Camargo et al. (2006) concluyen que el Suero Albúmina Bovino es un componente biológico sujeto a contaminación que puede perjudicar el desarrollo embrionario y fetal convirtiendo su función no tan clara.

Figura 3

Clivaje al día 3 de tratamiento con EGF.

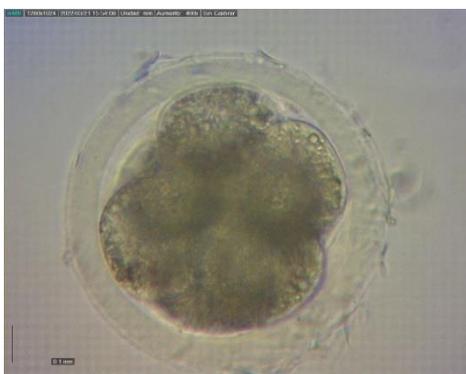
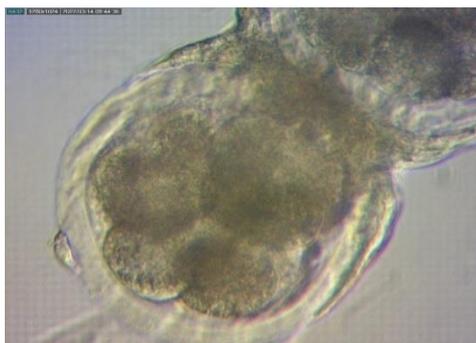


Figura 1

Clivaje al día 3 tratamiento control



Porcentaje de Apoptosis al 3er día

Según Sánchez (2014), la apoptosis es la muerte celular programada. Las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$) entre ambos tratamientos (Cuadro 11). La muerte apóptica actúa como un control de calidad, proveyendo un mantenimiento adecuado de tejidos y órganos, logrando el balance entre la muerte y la proliferación celular (Zamora et al. 2005). La función que desempeña la familia de receptores EGF/ErbB incluyen la regulación de supervivencia, réplica y movimiento de las células, de esta forma en la apoptosis existe una eliminación de restos celulares y se contrae el citoplasma; por ende, esta cumple una función en el desarrollo celular siendo parte del proceso biológico normal (Andrew et al. 2002).

Cuadro 11

Valores porcentuales de ovocitos fertilizados, ovocitos en clivaje y apoptosis al tercer día para los tratamientos con EGF y control.

Tratamiento	Ovocitos Fertilizados (%)	Ovocitos	
		Clivaje (%)	Apoptosis al día 3 (%)
EGF	84.85	81.25	18.75
Control	74.59	77.78	22.22
CV	8.2116	2.7620	6.4819
Probabilidad	0.0279		0.502

Nota. EGF= Factor de Crecimiento Epidérmico; CV= Coeficiente de Variación.

Porcentaje de Embriones

Se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos con EGF y control, siendo el tratamiento suplementado con EGF el que mostró un aumento en la producción de embriones con una diferencia de 14.43% (Cuadro 12). La selección del embrión comienza a partir del ovocito, el desarrollo que obtenga en la maduración hasta la división celular y la creación de blastocistos. La adición de EGF en el medio dio como resultado una mayor supervivencia de embriones congelados producidos *in vitro* (Bernal Ballesteros 2016). Esto se dio debido a que la suplementación con el factor de crecimiento epidérmico ejerció influencia sobre el desarrollo embrionario. La calidad del embrión la determina su estructura uniforme, sin contenciones de defectos visibles y contando con una zona

pelúcida intacta. Sin embargo, puede haber casos en los cuales los embriones excelentes no concluyan en preñez; la vaca receptora es un factor importante, el cual estipula la aceptación del embrión. De acuerdo con un estudio realizado por Lozano-Domínguez et al. (2010) determinaron que la calidad del embrión fue un factor que influyó sobre la tasa de gestación de las vacas receptoras.

Porcentaje de Mórulas y Blastocistos

Schneider et al. (1980) concluyeron que los mejores porcentajes de preñez se obtienen al transferir blastocistos, siendo por tanto el estadio que se desea obtener en mayor proporción cuando se realizan procedimientos de TE o FIV. Las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$) entre ambos tratamientos. El tratamiento con EGF presentó un mayor porcentaje de embriones y blastocistos, no siendo así con el porcentaje de mórulas que fue mayor con el tratamiento control. Similares hallazgos han sido reportados por Palomares Naveda et al. (2004) quienes suplementaron un medio de maduración con EGF en uno de sus tratamientos, lo cual mejoró la tasa de desarrollo hasta llegar al blastocisto obteniendo un porcentaje de 60%.

Figura 2

Mórula temprana obtenida a partir de la suplementación con EGF.

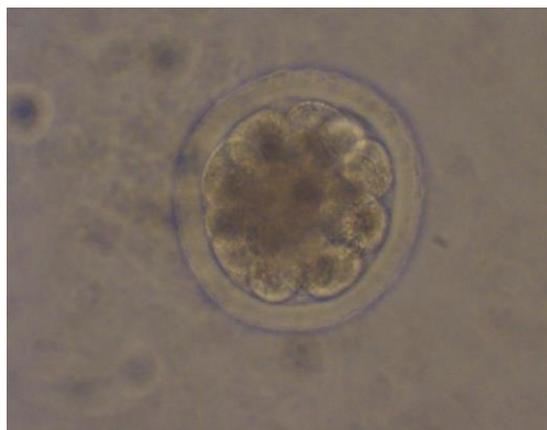
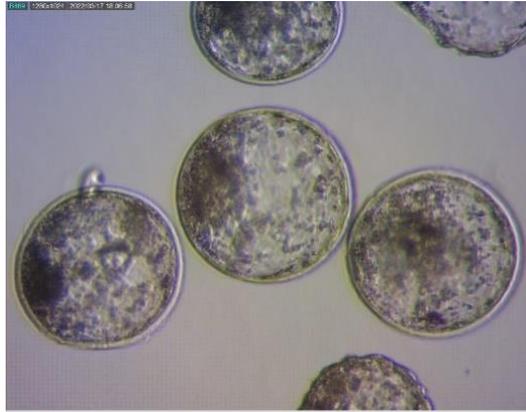
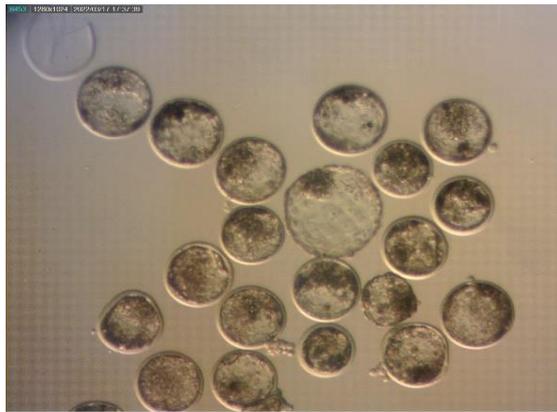


Figura 3

Blastocistos provenientes de la suplementación con EGF

**Figura 4**

Blastocistos obtenidos en el día 7 tratamiento control

**Figura 5**

Blastocisto expandido en el tratamiento con EGF



Cuadro 12

Valores porcentuales de embriones y su categoría para los tratamientos con EGF y control.

Tratamiento	Embriones (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
EGF	58.24	26.42	73.58
Control	43.81	45.65	54.35
CV	12.8701	22.2883	15.3592
Probabilidad	0.0439		0.0458

Nota. EGF= Factor de Crecimiento Epidérmico; CV= Coeficiente de Variación.

Eficiencia General

Se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos con EGF y control, siendo el tratamiento con EGF el que mostró los mejores resultados en la relación embriones producidos/ovocitos viables, embriones producidos/ovocitos madurados, embriones producidos/ovocitos fertilizados, y embriones producidos/ovocitos en clivaje, superando siempre al tratamiento control en un 16.21%, 14.74%, 13.25%, 14.43%, respectivamente (Cuadro 13).

Cuadro 13

Eficiencia del procedimiento del FIV, relacionando los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje utilizando EGF.

Tratamiento	Embriones/ ovocitos viables (%)	Embriones/ ovocitos madurados (%)	Embriones/ ovocitos fertilizados (%)	Embriones/ ovocitos en clivaje (%)
EGF	36.30	40.15	47.32	58.24
Control	20.09	25.41	34.07	43.81
CV	23.1400	18.3889	13.8482	12.8701
Probabilidad	0.0005	0.0056	0.0344	0.0439

Nota. EGF= Factor de Crecimiento Epidérmico.

Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, los mejores porcentajes de maduración, fertilización y embriones se obtuvo con el medio de maduración suplementado con el Factor de Crecimiento Epidérmico EGF.

Los mayores porcentajes de embriones en estado de blastocistos y blastocistos expandidos se lograron con la suplementación del factor EGF.

La mejor eficiencia general del proceso de producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos se obtuvo con la suplementación del EGF en el medio de maduración.

Recomendaciones

Implementar el uso del EGF en los procedimientos de PIV en el laboratorio de biotecnología de la reproducción animal de Zamorano.

Evaluar el efecto de la suplementación del Factor de Crecimiento Epidérmico EGF a mayores concentraciones a las utilizadas en esta investigación.

Comparar el factor de crecimiento epidérmico EGF con otros factores de crecimiento.

Evaluar las tasas de preñez con los embriones obtenidos a partir de la suplementación con el Factor de Crecimiento Epidérmico EGF en vacas receptoras.

Referencias

- Andrew J, Danielsen., Nita J. 2002. The EGF/ErbB Receptor Family and Apoptosis. Growth Factors; [consultado el 18 de jun. de 2022]. 20:1–15. doi:10.1080/08977190290022185.
- Bernal Ballesteros BH. 2016. Influencia de la suplementación del medio de maduración y de cultivo en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos *in vitro* [Tesis]. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; [consultado el 13 de jun. de 2022]. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/4609>.
- Cabrera V. P, Yoong K. W, Gamarra L. G. 2012. Evaluación de la fertilidad *in vitro* del semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú; [consultado el 18 de jul. de 2022]. 20(1). doi:10.15381/rivep.v20i1.527.
- Camargo L, Viana J, Sá W, Ferreira A, Ramos A, Vale Filho A. 2006. Factors influencing *in vitro* embryo production. Animal Reproduction; [consultado el 17 de jun. de 2022]. 3:19–28. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a607cf7783717068b47b6/pdf/animreprod-3-1-19.pdf>.
- Goicochea Vargas J, Rondón Jorge W, Acosta Pachorro F, Gómez Marín Y, Montalvo Martin M, Salvatierra Alor M, Martel Falcón J, Ballarte Zevallos O, Díaz Zegarra J, Ratto Fuster M. 2021. Efecto de dos medios de fertilización en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos criollos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 32(5):e18709. doi:10.15381/rivep.v32i5.18709.
- Gonella Diaza ÁM, Atuesta Bustos JE, Bernal Ulloa SM, Chacón Liliana. 2013. Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 4(1):65. doi:10.22490/21456453.1967.
- Hafez E, Hafez B. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7ª ed. Somerset: John Wiley & Sons, Incorporated. 525 p. ISBN: 9781118710708. en.
- Hansen J. 2013. *In Vitro* Production of Bovine Embryos. Gainesville, Florida: University of Florida; [consultado el 9 de jun. de 2022]. 47 p. https://animal.ifas.ufl.edu/hansen/ivf_docs/University%20of%20Florida%20Bovine%20IVP%20Manual%20ver%2010.16.2013.pdf.
- Harper KM, Brackett BG. 1993. Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. Biology of Reproduction. 48(2):409–416. eng. doi:10.1095/biolreprod48.2.409.
- Katchicualula A. 2011. Producción *in vitro* de embriones bovinos: efecto de la adicción combinada de los factores de crecimiento egf, igf-i, fgfb y pdgf en los medios de maduración de ovocitos y de cultivo embrionario. España; [consultado el 18 de jul. de 2022]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=104822>.
- Krisher RL. 2004. The effect of oocyte quality on development. J Anim Sci. 82 E-Suppl:E14-23. eng. doi:10.2527/2004.8213_supplE14x.
- Liu B, Cui Y, Yu S. 2013. Effect of Swim-Up and Percoll Treatment on Sperm Quality and *In vitro* Embryo Development in Yak. Journal of Integrative Agriculture. 12(12):2235–2242. doi:10.1016/S2095-3119(13)60378-0.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. Mol Reprod Dev. 37(1):48–53. eng. doi:10.1002/mrd.1080370107.

- Lozano-Domínguez RR, Asprón-Pelayo MA, Vásquez-Peláez CG, González-Padilla E, Aréchiga-Flores CF. 2010. Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Revista Mexicana de ciencias pecuarias*. 1(3). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242010000300001.
- Merton J, Roos A de, Mullaart E, Ruigh L de, Kaal L, Vos P, Dieleman S. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59(2):651–674. doi:10.1016/S0093-691X(02)01246-3.
- Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. med. vet.* 38(2). doi:10.4067/S0301-732X2006000200002.
- Palasz AT, De la fuente J. 2019. Cultivo de embriones bovinos: Efectos de los medios de cultivo y de los requerimientos fisiológicos sobre la calidad de los embriones producidos *in vitro*. Dept. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos. INIA, Madrid: [sin editorial].
- Palomares Naveda R, Hernández Fonseca H, Soto Belloso E, González Fernández. 2004. Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) durante la maduración de oocitos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos. [sin lugar]: [sin editorial]. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95914210.pdf>.
- Palomino W. 2019. Efecto de la suplementación de dos agentes capacitantes en el medio de fertilización para la producción *in vitro* de embriones en alpacas (*Vicugna pacos*) a 2750 msnm. Ayacucho, Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL. 100 p. http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/3503/TESIS%20MV179_Pal.pdf?sequence=1.
- Parrish JJ. 2014. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. 81(1):67–73. eng. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.08.005.
- Quispe CE, Ancco G. E, Solano A. J, Unchupaico P. I, Mellisho S. E. 2018. Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*; [consultado el 18 de jul. de 2022]. 29(4):1114–1121. doi:10.15381/rivep.v29i4.14418.
- Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A, Gandolfi F. 1998. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil*. 112(1):123–130. eng. https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/112/1/jrf_112_1_014.xml. doi:10.1530/jrf.0.1120123.
- Salgado-Cruz E, Lopera Vasquez R. 2020. Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización *in vitro* en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 31(3):e17138. doi:10.15381/rivep.v31i3.17138.
- Salgado-Otero R, Simanca-Sotelo J, Vergara-Garay O. 2013. Redalyc.Efecto del factor de crecimiento epidermal (EGF) sobre la maduración de ovocitos bovinos cultivados *in vitro*. *Revista Científica, FCV-LUZ*; [consultado el 9 de nov. de 2021]. 23(4):325–328. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95926991004.pdf>.
- Sánchez B. 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. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. spa. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/3494>.

- Schneider HJ, Castleberry RS, Griffin JL. 1980. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*. 13(1):73–85. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691x80900163>. doi:10.1016/0093-691X(80)90016-3.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 9(1):35–48. eng. doi:10.1093/humupd/dmg009.
- Thompson J. 2000. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos — a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*. 60-61:263–275. doi:10.1016/S0378-4320(00)00096-8.
- Zamora S JD, Otárola A IC, Brenes G O. 2005. La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Revista chilena de nutrición*. 32(3). en. doi:10.4067/s0717-75182005000300002.

Anexos

Anexo A

Preparación de medios.

Medio de colección para ovocitos inmaduros: el mezclado con BSA TL HEPES es un medio, de un pH estable a condiciones ambientales. De esta manera, es posible seleccionar, clasificar y larvar los ovocitos dentro de este medio.

Medio de capacitación: TL solución stock para capacitación espermática. 120 mg BSA fue disuelta en 20 mL de TM solución stock. A esta solución se le agregó 1000 μL de piruvato de sodio solución stock y 200 μL de gentamicina. Luego la solución fue aspirada a una jeringa y esterilizada por filtración a 0.22 μm . seguidamente se coloca en tubos de reacción que fueron equilibrados abiertos en la incubadora.

Medio de fertilización: 60 mg de suero albúmina bovino EFAF fueron disueltos en 10 ml solución stock, a la cual se le agregan 100 μL de piruvato de sodio y 200 μL de heparina solución stock, luego se aspiró y fertilizó por filtración.

Medio de cultivo: 10 ml de SOF solución stock fueron mezclados con 400 μL de aminoácidos esenciales y 100 μL de aminoácidos no esenciales y 1 ml Suero de Vaca en Celo OCS, se mezcló bien y se esterilizó por filtración. Para prevenir contaminación se añadió 60 μL de gentamicina.

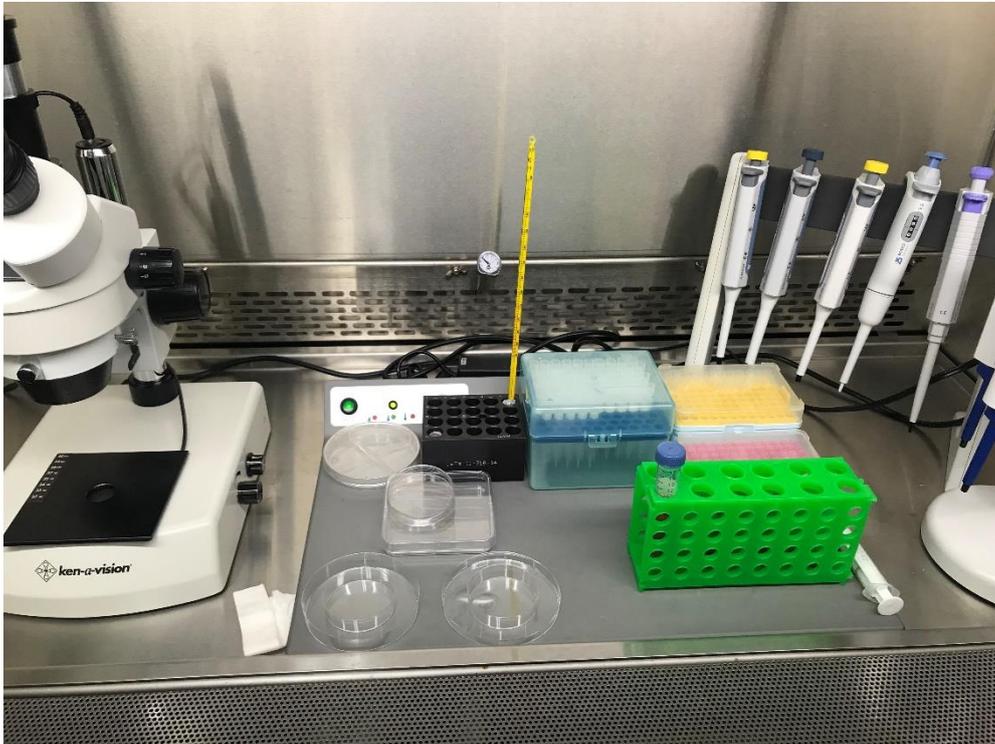
Anexo B

Aspiración folicular mediante el método de punción.



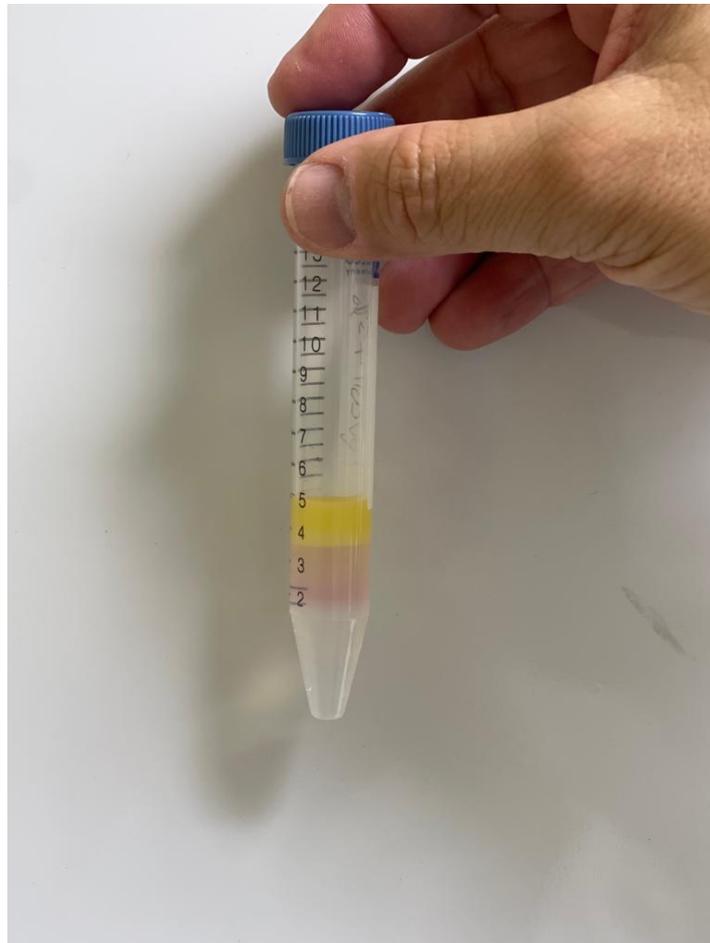
Anexo C

Materiales utilizados.



Anexo D

Procedimiento de sotoposición.



Anexo E

Incubadoras equilibradas.



Anexo F

Microgotas flotantes para maduración in vitro.

