

**Implementación de un protocolo de
Fertilización *in vitro* en bovinos en el
Laboratorio de Reproducción Animal de
Zamorano**

**Jessica García Recillas
José Luis Martínez Quintero**

**Escuela Agrícola Panamericana; Zamorano
Honduras
Noviembre, 2013**

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Implementación de un protocolo de
Fertilización *in vitro* en bovinos en el
Laboratorio de Reproducción Animal de
Zamorano**

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

Presentado por

**Jessica García Recillas
José Luis Martínez Quintero**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2013

Implementación de un protocolo de Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano

Presentado por:

Jessica García Recillas
José Luis Martínez Quintero

Aprobado:

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor Principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Isidro A. Matamoros, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Rogel Castillo, M. Sc.
Asesor

Implementación de un protocolo de Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano

Jessica García Recillas
José Luis Martínez Quintero

Resumen: La producción de embriones *in vitro* actualmente ha cobrado importancia en el sector ganadero por ser una técnica que ayuda a la mejora genética y eficiente producción. Sin embargo, para llegar a crear embriones se necesita un protocolo que proporcione metodologías que ayuden a obtener mejores resultados, es por eso que el objetivo de este estudio fue implementar un protocolo de fertilización *in vitro* en bovinos tomando como base el protocolo realizado por el Dr. Hansen de la Universidad de Florida. El experimento se llevó a cabo entre septiembre y noviembre de 2012 en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Por medio de la técnica de aspiración folicular y con ayuda de una jeringa de 5 mL de dos piezas y agujas calibre 18 x 1½ pulgadas se aspiraron 69 ovarios de matadero de los cuales se extrajeron 444 oocitos, 152 (34.23%) se clasificaron como degenerados y 292 (65.76%) fueron viables, dando un promedio de 4.2 oocitos viables por ovario; de los 292 oocitos viables se maduraron 232 (79.45%) presentando una expansión de las células del *cumulus oophorus* y 60 (20.55%) no maduraron; del total de oocitos madurados 101 (43.53%) fueron fertilizados y 131 (56.46%) no fueron fertilizados; de los 101 oocitos fertilizados 56 (55.4%) presentaron división celular (clivaje) y 45 (44.5%) estuvieron en muerte celular (apoptosis), obteniendo 30 (53.57%) blastocistos al séptimo día.

Palabras clave: Apoptosis, blastocisto, clivaje, *cumulus oophorus*, oocitos.

Abstract: Actually embryo production in vitro, is very important in cattle sector it is a technical to help in genetic and efficient production. However, the embryo's creation needs a protocol, whose it gives methodologies that help to obtain best results, it is the study reason was implementation a protocol of fertilization in vitro in bovines with base in the protocol to Hansen, PhD. Florida University. In these study was elaborated on September to November on 2012 in Animal Reproduction Laboratory of Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. The method, follicular aspiration, used a 5 mL syringe with two pieces and gauge needles 18 x 1½ inches, aspirated 69 meat's plant ovaries, they was extracted 444 oocytes, 154 (34.23%) were degenerate and 292 (65.95%) were viable, the average was 4.2 oocytes viable per ovarie; of 292 viables oocytes matured 232 (79.45%) they had a cumullus oophorus cells expansion and 60 (20.55%) didn't mature; the oocytes total matured 101 (43.53%) was fertilized and 131 (56.46%) didn't fertilize; to 101 fertilized oocytes 56(55.45%) had cellular division (clivaje) and 45 (44.5%) were in cellular dead (apoptosis), finally 30(53.57%) blastocysts to seven days.

Keys words enzymatic: Apoptosis, blastocyst, clivaje, *cumulus oophorus*, oocytes.

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.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4 CONCLUSIONES	17
5 RECOMENDACIONES	18
6 LITERATURA CITADA	19
7 ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
Formulación para la preparación de las soluciones del TL	4
Formulación para los medios de TALP usando suplementos y soluciones de Tecnologías Celular y Molecular.....	4
Ingredientes para la formulación de medio SOF.....	5
Número de oocitos recuperados utilizando la técnica de aspiración ovárica.....	10
Porcentaje de Maduración <i>In Vitro</i> (MIV).....	11
Porcentaje de fertilización <i>in vitro</i> de oocitos bovinos.....	13
Porcentaje de clivaje y apoptosis.....	14
Porcentaje de blastocitos obtenidos al día siete.....	15

Figuras	Página
Oocitos obtenidos de la punción ovárica con sus estructuras. A) Oocito viable B) Oocito degenerado.....	11
Oocitos obtenidos de maduración <i>in vitro</i> . A) Partes de un oocito madurado.....	12
Oocitos fertilizados en el día cero del proceso de fertilización <i>in vitro</i>	13
Embriones en clivaje obtenidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de la EAP Zamorano. A) Estados embrionarios de clivaje. B) Selección de blastocistos con la pipeta Drummond.....	14
Imagen a los 5 días de cultivo en el fluido sintético del oviducto (SOF).....	15
Blastocistos al día 7.....	16

Anexos	Página
Preparación de los medios stock.....	22
Primer lavado de oocitos extraídos.....	24
Segundo lavado de oocitos extraídos.....	25
Tercer lavado de oocitos extraídos.....	25
Cuarto lavado de oocitos extraídos.....	26
Cultivo de embriones al día 0.....	26
Cultivo de embriones al día 5.....	27
Embrión colocado en pajueta.....	27

INTRODUCCIÓN

La producción pecuaria en la actualidad es el sector con mayor crecimiento debido al incremento en la demanda de productos de origen animal principalmente en países desarrollados, esto como consecuencia del crecimiento poblacional y la urbanización. Se estima que para el año 2020 la ganadería será el sector agropecuario con mayor importancia, es por eso que hoy en día se estimula el empleo de biotecnología que ayuden a incrementar la eficiencia ganadera para satisfacer la demanda de los consumidores, todo esto a un bajo costo para que puedan ser accesibles (Ruane y Zimmermann 2003).

La biotecnología de la reproducción tiene como objetivos: mejorar genéticamente individuos que contribuyan a ser más eficientes y productivos, y mejorar el tema de producción de crías las cuales deberán tener características superiores a las de sus progenitores. Para realizar esto la biotecnología se apoya de algunas herramientas como son: la inseminación artificial y la preservación de semen, las cuales se consideran como las técnicas más utilizadas debido a que son la base para el desarrollo de tecnologías importantes como la micro manipulación de embriones, producción de quimeras y animales transgénicos. Existen otras técnicas cuyo propósito es mejorar la eficiencia reproductiva y la tasa de reproducción, para estas se utiliza el sexado de espermatozoides, superovulación, transferencia de embriones, producción de embriones *in vitro* y clonación (Madan 2005).

La Fertilización *In Vitro* (FIV) es una metodología realizada en laboratorio, donde el oocito maduro se expone a espermatozoides previamente capacitados para que se produzca la fecundación proporcionando las condiciones óptimas que simulen lo que ocurre de forma natural (Lorenzo 1994). La FIV tiene como propósito producir embriones, llevarlos a estadios avanzados para posteriormente ser transferidos a una hembra receptora (Quintana *et al.* 2012). Se debe destacar que la eficiencia de esta técnica es inferior a la eficiencia que se obtiene de forma natural. La FIV tiene numerosas ventajas entre las que destacan:

- Permite producir embriones a bajo costo, lo que permite implantar embriones de ganado de carne a vacas de aptitud láctea las cuales pueden tener problemas de infertilidad.
- Eleva el rendimiento de producción de embriones en hembras de alto valor genético, se pueden obtener oocitos de novillas a una edad de 6 meses, en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las dos a tres semanas de parto (Galli *et al.* 2001).

- Permite obtener crías de hembras de buena calidad genética que por diversos problemas (infertilidad, alteraciones estructurales y funcionales del tracto genital así como enfermedades infecciosas o edad) deban de ser sacrificadas.
- Facilita la utilización de semen sexado (Herradón *et al.* 2007)

La FIV ayuda a la producción de embriones *in vitro* la cual permite exportar e importar germoplasma de forma segura. Por el dominio que se tiene de las características de los progenitores en laboratorio, permite hacer un mejoramiento genético seleccionando a las hembras y machos que presenten las mejores características así como realizar evaluaciones genéticas (Ríos 2001). La producción de embriones *in vitro* consta de cuatro fases fundamentales:

Obtención de oocitos: Los ovarios son los órganos responsables de la producción de oocitos, son obtenidos a través de la aspiración folicular con ayuda de una jeringa de 5 mL y aguja calibre 18 x 1^{1/2} pulgada, se seleccionan los folículos que presenten un tamaño entre 2 a 8 mm de diámetro ya que estos oocitos proporcionan un buen porcentaje de desarrollo, si se utilizan oocitos menores de 2 mm se obtiene un menor porcentaje de maduración y fertilización a comparación de los oocitos extraídos de folículos más grandes.

Después se realiza la selección de oocitos tomando en cuenta tres criterios: el diámetro de los oocitos, el aspecto de su citoplasma y las características de las células del *cumulus oophorus* que los rodea. El diámetro condiciona la capacidad para madurar, si se tiene un oocito menor a 110 µm se dice que está en fase de crecimiento y no tiene capacidad para madurar.

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

Los oocitos que presentan un citoplasma más oscuro tienen una mayor acumulación de lípidos y buen potencial de desarrollo que los que presentan una coloración pálida. Sin embargo, cuando los oocitos presentan una coloración negra significa que estos están envejecidos y su potencial de desarrollo es muy bajo (Nagano *et al.* 2006).

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

La evaluación de los oocitos maduros se basa en la observación, cuando las células del *cumulus oophorus* han llegado a su nivel máximo de expansión. La eficiencia de la maduración *in vitro* y la fertilización está relacionada con el medio de cultivo, este debe proporcionar a los oocitos fuentes energéticas proteicas, minerales, antibióticas y

hormonales que son necesarias para que presenten un buen desarrollo (Memili *et al.* 2007). También se debe proporcionar condiciones fisicoquímicas que simulen el ambiente natural en el oviducto como lo son temperatura, pH, presión osmótica y la composición atmosférica (Yang *et al.* 1998).

Fecundación de oocitos maduros: Esta fase consta de dos pasos, el primero consiste en seleccionar los espermatozoides más viables eliminando espermatozoides muertos o de baja viabilidad, y el segundo paso es la fertilización.

Cultivo de embriones: El cultivo de embriones se basa en el uso de diferentes medios para el desarrollo de las primeras etapas embrionarias. De acuerdo a sus características los cultivos se clasifican en tres categorías: indefinidos, cuando se utiliza suero y cocultivo con células somáticas; semidefinidos cuando se omite el cocultivo y el suero se reemplaza por albúmina sérica y definidos, cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona (Herradón *et al.* 2007).

Sin embargo, los medios simples más utilizados para el cultivo de los embriones bovinos son: el fluido oviductal sintético, con base a los componentes encontrados en el fluido oviductal bovino, y el medio KSOM (Liu y Foote 1995), ayudando así a que cada vez más se vaya buscando componentes para la eficaz nutrición de los embriones. Recordando que estos medios todavía necesitan ser mejorados sensiblemente, puesto que el cultivo de los embriones producidos *in vitro* en el interior del oviducto incrementa notablemente la calidad de los mismos.

Con base en lo anterior, en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano se realizó una investigación que tuvo como objetivo general Implementar un protocolo para el proceso de Fertilización *in vitro* en bovinos tomando como base el protocolo propuesto por el Dr. Peter J. Hansen de la Universidad de Florida, USA., y como objetivos específicos determinar el porcentaje de maduración *in vitro*, fertilización, clivaje y apoptosis así como el porcentaje de blastocistos obtenidos a los siete días de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo entre los meses de septiembre y noviembre de 2012 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 Delikatessen ubicada en el Valle del Yeguaré, a 5 km de la Escuela Agrícola Panamericana. Una vez sacrificada la hembra se extrajo los ovarios y se mantuvieron en la solución de transporte a 35 °C.

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS STOCKS. (Anexo 1).

Solución Salina de Transporte de ovarios (0.9%). Se realizó la solución salina al 0.9% agregando 9 NaCl g por litro de agua bidestilada y se almacenó a 4 °C. A todos los medios se les colocó etiquetas indicando el contenido, fecha e iniciales del técnico que lo elaboró.

Medio de Colección de Ovocitos (OCM por sus siglas en inglés). Se disolvió el TCM-199 (sin rojo de fenol y sin L- glutamina) y Hyclone para 10 L, 3.50 g NaHCO₃ en 9 L de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 7.2-7.4 y el volumen a 10 L, este volumen se filtró y esterilizó. El medio se colocó en botellas estériles de medio litro con 400 mL cada botella y conservó a 4 °C indefinidamente.

La noche antes de usar se agregó: solución # 4: BSS + Heparina, solución # 11: glutamina (4 mL) y la solución # 15: Penicilina/Estreptomicina (4 mL). Se cambió la etiqueta adicionando los suplementos, la fecha y se utilizó desde el mismo día hasta una semana como máximo.

Medio de Maduración de Oocitos (CCOs). Se preparó una solución de 87 mL de TCM-199 y se almacenó a 4 °C hasta su uso. La noche antes de usar se agregó: solución # 3: BSS, solución # 8: gentamicina, 125 µL de solución # 6: Folltropin, 200 µL de solución # 5: Estradiol, un microlitro de solución # 2: Piruvato de Sodio, un mililitro de solución # 25: Glutamax y se adicionó 500µL. Se cambió la etiqueta (TCM-199) por Medio de Maduración de Oocitos y se usó en un plazo de 1 semana.

Soluciones de TL – Preparación de TALPs. Mezclar los ingredientes descritos en el Cuadro 1, se esterilizó y filtró la solución. Se escribió la fecha de elaboración y vencimiento en la etiqueta (usarse en un plazo de una semana). 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). Se mezclaron los ingredientes según lo descrito en el Cuadro 2. Se esterizaron y filtraron las soluciones (se usó en un plazo de una semana). 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 (µL)	80	150	50
Solución 7: heparina (µL)	0	0	250

Medio 10x SP-TL. Para preparar la solución 10x SP-TL se disolvió en 100 mL de agua: 4.675 g de NaCl, 0.23 g de KCl, 0.40 g de NaH₂PO₄+H₂O, y 2.38 g de HEPES. Se ajustó el pH a 7.3, se filtró para esterilizar y almacenó indefinidamente a 4 °C.

Percoll 90%.

1. Se colocaron 4 mL de 10X SP-TL en un vaso volumétrico pequeño y se agregó 0.084 gr de bicarbonato de sodio y 90 µL de Lactato de Sodio (Solución 1).
2. Se mezcló hasta que el bicarbonato se disuelva.
3. Se agregaron 36 mL Percoll.
4. Se agregaron 158 µg de MgCl₂ (Solución 12) y 78 µg de CaCl₂ (Solución 13).
5. Mientras se mezclaban los ingredientes anteriores, se ajustó el pH a 7.3-7.45 y se filtró con un filtro de 0.45 micras (en un tubo filtrante de 50 mL o filtro similar de botella filtro con tapa). Si se forma un precipitado en la solución de Percoll continuar revolviendo. Si los compuestos no se disuelven entonces recomenzar el proceso. Es

muy fácil la precipitación si el ácido o la base se agregan rápidamente durante el ajuste del pH. Por lo tanto, se recomienda que este paso se ejecute lentamente.

SOF (Fluido Sintético de Oviducto). Se utilizó la formulación descrita por Fischer-Brown *et al.* Zygote 10:341-348 (2002), modificando la concentración de Gentamicina y de Albumina Sérica Bovina Libre de Ácido Graso. Se compró el medio como formulación de Tecnologías Celular y Molecular. Se suplementó el medio con 0.4 mL de Piruvato de Sodio, 20 µL de Aminoácidos no Esenciales, 10 µL de Aminoácidos Esenciales, y 0.025 mg/mL de Sulfato de Gentamicina (es decir, 10x más que lo utilizado para KSOM-BE2). Se agregó Albúmina Sérica Bovina Libre de Acido –Graso para alcanzar una concentración final de 8 mg/mL BSA.

200X de Piruvato de sodio. Se colocó 0.88gr de Piruvato de Sodio en 100 mL H₂O, se esterilizó, filtró y almacenó por un mes a 4⁰C (Cubrir el frasco con papel aluminio que no reciba luz).

SOF modificado (50 mL). A la formulación de SOF (Cuadro 3) se le agregó 0.25 mL 200X de Piruvato del sodio, un mililitro de Aminoácidos no esenciales, 0.5 mL de Aminoácidos Esenciales, 0.25 mL de Gentamicina (sulfato) y 400 mg de EFAF-BSA.

Cuadro 3. Ingredientes para la formulación de medio SOF.

Ingredientes	mL
CaCl₂ 2H₂O	1.17
KCl	7.16
KH₂PO₄	1.19
MgCl₂ 6H₂O	0.49
NaCl	107.70
NaHCO₃	25.07
Lactato de sodio (60%)	3.3
Piruvato de sodio	0.4
BSA (mg/l)	8000
Gentamicina (U/l)	500 000
Amino Ácidos esenciales (mL/l)	10
Amino Ácidos no esenciales (mL/l)	20

PROTOCOLO DE FERTILIZACIÓN *IN VITRO*

Lavado de los ovarios. Una vez que los ovarios se encontraron en el Laboratorio se lavaron con solución de transporte (debe estar en la estufa a 38 °C), se colocaron en una solución nueva y permanecieron a temperatura ambiente hasta que se inició el proceso de aspiración.

Recolección de los oocitos. Se inició desinfectando todo el material con etanol al 70%. Se prepararon tres placas de maduración (placas de Petri redondas de 60 mm) con microgotas flotantes de 50µL de Medio de Maduración de oocitos, se cubrieron con aceite mineral y se llevaron a la incubadora a 5% de CO₂ y 38.5 °C a fin de gasificarlas por lo menos tres horas antes de depositar los oocitos (a cada microgota se le colocarán 10 oocitos). Se identificó las placas con iniciales y fecha.

Los ovarios estuvieron a temperatura ambiente hasta que se comenzó a trabajar (se deben utilizar guantes de látex sin talco). Se seleccionaron los ovarios con mayor cantidad de folículos y se desecharon aquellos con cuerpos lúteos grandes y quistes. Los ovarios a utilizar se colocaron en un beaker limpio con el mismo medio de transporte (Solución Salina).

Se colocó en baño María (a 38 °C a fin que se atempere) un beaker con 100 mL de OCM y cuatro tubos de policarbono estériles, a cada uno se le agregó 5 mL de OCM. La mesa de trabajo donde se aspiraron los ovarios se cubrió con papel toalla y en la platina térmica (38° C) se colocó una placa de búsqueda (grid) y una placa nunclon de cuatro pozos con OCM. Se preparó la pipeta de transferencia (Drummond), se desinfectó el émbolo con etanol y se colocó la punta.

Para la aspiración de los ovarios se utilizaron jeringas de 5 mL de dos piezas y agujas calibre 18 x 1¹/₂ pulgadas. A medida que se fueron aspirando los folículos el líquido folicular fue depositado en uno de los tubos de policarbono de 50 mL, una vez terminado el procedimiento de aspiración se dejó reposar los tubos de policarbono por 5 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante muy suavemente teniendo cuidado de no crear turbulencia en el fondo ya que se pueden perder los oocitos, para este proceso se utilizó una pipeta de precisión de 1000 µL. El precipitado se vació a la placa grid y cada uno de los tubos de 50 mL se lavó con OCM atemperado en dos ocasiones a fin de recuperar los oocitos que pueden quedar pegados a las paredes del tubo.

Una vez realizado el procedimiento anterior se inició la búsqueda y clasificación de los oocitos utilizando la pipeta Drummond, estos se transfirieron a los pozos de la placa nunclon que contenía OCM para iniciar con el lavado de dichos oocitos. Una vez lavados se colocaron 10 oocitos en cada una de las microgotas antes elaboradas y estas fueron llevadas a la incubadora donde permanecieron durante 24 horas.

Preparación de las placas de fertilización y del semen. Se realizaron en la mañana del segundo día (día 0) dos o tres horas antes de la fertilización. Todo se llevó a cabo dentro de la Campana de Flujo Laminar, previamente desinfectada con etanol al 70%. Se suplementó el medio de IVF-TALP (frasco de 100 mL nuevo).

1. Se pesó 0.6 g de BSA-EFAF, se agregó al frasco de IVF-TALP y se mezcló muy suavemente.
2. Se agregó un mililitro de Piruvato de sodio (Solución 2) (debe estar en la nevera forrado con papel aluminio).
3. Se agregó 100 μ L de gentamicina (Solución 8).
4. Se agregó 500 μ L de heparina (Solución 7). Mientras se dejó disolver el medio y se procedió a preparar los tubos cónicos.
5. Se filtró el medio de IVF-TALP a través de un filtro milipore 0.22 μ m en otro frasco estéril.
6. Se llenaron completamente cuatro tubos cónicos de 15 mL con Hepes TALP (HepesTL), se taparon y se llevaron a la estufa.
7. Se agregó 10 mL en un tubo cónico de 15 mL de Hepes TALP. Se tapó y se llevó a la estufa.
8. Se agregó 5 mL de IVF-TALP a un tubo cónico de 15 mL y se puso la tapa pero no se cerró, posteriormente se llevó a la incubadora (a fin de que se equilibren los gases).
9. Se prepararon las placas de fertilización de cuatro pozos según el número de oocitos que se están madurando, se agregó 600 μ L de IVF-TALP, se calculó más o menos 30 oocitos por pozo y se llevó a la incubadora. Se identificó las placas con iniciales y fecha.

Elaboración del Percoll:

1. Para la elaboración de Percoll al 45% se agregó a un tubo cónico de 15 mL: 1.5 mL de Percoll al 90%, 1.5 mL de Sperm-TALP. Se mezcló en el vortex (una sola vez). agregó a un tubo cónico de 15 mL, 3 mL de percoll al 90%
2. Se puso a calentar el agua donde se descongeló el semen (37-38°C).

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

Con una pipeta Pasteur plástica se colocó muy lentamente y en el fondo del tubo del Percoll al 45%, el Percoll al 90% sin perturbar el medio. Se observó el menisco de separación entre el Percoll al 90% abajo y el Percoll al 45% arriba. Se llevó cuidadosamente a la estufa. Este procedimiento también se puede realizar al revés, colocar el Percoll al 45% a través de las paredes sobre el Percoll al 90%.

Se sacó del congelador un tubo eppendorf que contenía la Solución de penicilina, hipotaurina y epinefrina (PHE), se cubrió con papel de aluminio y se colocó en la estufa (38° C), así mismo se colocaron los contenedores de la centrífuga. Se preparó microscopio para evaluar el semen.

Se preparó una placa nunclon de cuatro pozos con el Hepes TALP se llenaron dos de los cuatro pozos de la placa y se colocó sobre la platina calentadora. Es importante que haya un calentador donde se va a trabajar el semen para evitar el shock de frío a los espermatozoides.

Se descongelaron a 37 °C en un termo por 60 segundos tres pajuelas de semen de toros diferentes, se secaron bien y se cortó cada pajuela con una tijera, se montó la pistola de inseminación empujando suavemente el semen sobre el Percoll que estaba en la incubadora. El semen debe colocarse sin perturbar el medio encima del gradiente de 45%. Se agregaron las tres pajuelas sobre el Percoll y este fue llevado a la centrifuga la cual funcionó a 1000 x g (2.5) por 10 min.

Mientras se encontraba el percoll en la centrifuga se sacaron las placas con los oocitos maduros y se transfirieron del Medio de Maduración de Oocitos (OMM) a la placa nunclon de cuatro pozos que se encontraba en la platina calentadora con HEPES-TALP, se lavaron en los diferentes pozos (normalmente se hacen los grupos de 30 oocitos y se lavan una sola vez). Se sacó la placa de fertilización de la incubadora la cual contenía IVF-TALP y que se encontraba gasificándose en la incubadora, los oocitos previamente lavados fueron transferidos con la Drummond (30 oocitos por pozo). La placa de fertilización se llevó nuevamente a la incubadora. Este procedimiento se debe realizar con la mayor brevedad posible.

Pasados los 10 minutos de centrifugación se extrajo el pellet del fondo del tubo con una pipeta Pasteur (debe tratarse de tomar únicamente el pellet porque el Percoll es tóxico para los espermatozoides) y se colocó en el tubo que contenía Sperm-TL, posteriormente el tubo con el pellet y el Sperm-TL se llevaron nuevamente a la centrifuga a 200 x g (1.5) por 5 min. Finalmente se eliminó el excedente, sin perturbar el medio y se tomó únicamente el pellet del fondo del tubo.

Al pellet obtenido se le agregó medio IVF-TL que se tenía en la incubadora y se pipetearon muy suavemente los espermatozoides. Se tomó una muestra, se observó en el microscopio y se calculó la motilidad individual de los espermatozoides sin usar laminilla. Posteriormente se sacaron las placas de fertilización de la incubadora y se colocan sobre la platina calentadora, se agregaron 25 µL de semen por pozo y 25 µL de PHE que estuvo en la estufa. Se llevó la placa a la incubadora de 18 a 20 horas.

Cultivo de los Embriones. Después de 18-20 horas se prepararon las microgotas flotantes de 50 µL con el medio SOF suplementado, se cubrieron con aceite mineral y se llevaron a la incubadora a 5% de CO₂ y 38.5° C. Calculando dos a tres horas antes de terminar el tiempo de fertilización se colocó en la platina calentadora una placa X de 90 mm a la cual se le agregaron 5 mL de medio HEPES-TL en tres de los cuatro pozos y se colocó un beaker de 50 mL con HEPES-TL. Se tomó el tubo eppendorf con la hialuronidasa del congelador y se puso en la estufa a 38 °C. Una vez descongelada se le agregó con una micropipeta un mililitro de HEPES-TL, se mezcló bien y se colocó sobre la platina calentadora.

Se sacó la placa de fertilización de la incubadora y se transfirieron los presuntos oocitos fertilizados con la pipeta Drummond al tubo eppendorf. Se dejó reposar por dos a tres minutos y posteriormente se extrajo el excedente del medio con mucho cuidado dejando nada más la parte final del tubo donde se encuentran sedimentados los embriones. Después se llevó al vortex durante 5 minutos y se agregó con una Pasteur plástica

HEPES-TL, se lavó bien el tubo eppendorf incluyendo la tapa y los embriones se colocaron en el pozo de la placa X que no tenía medio.

Se lavaron los embriones agrupando 30 en cada pozo de la placa nunclon, se realizaron tres lavados para finalmente transferirlos a la placa de cultivo de igual manera se colocaron 30 embriones por pozo de la placa. Se evaluó el porcentaje de divisiones a los tres días y porcentaje de blastocitos a los ocho días.

Día tres pos FIV- determinación del desarrollo embrionario.

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

Día cinco pos FIV- adición de suero.

1. Se colocó el tubo eppendorf de suero fetal inactivado con calor (solución 24) en la incubadora una a dos horas antes de agregar a las microgotas que contienen los embriones.
2. Pre-calentar el aire colocando el calentador delante de la platina térmica.
3. Colocar las placas de cultivo en la platina térmica y agregar 5 μ L de suero fetal bovino sometido a un tratamiento térmico filtrado estéril a cada microgota y volver a la incubadora.

Días siete a nueve pos FIV- evaluación final.

1. Se pre-calentó el microscopio, se colocó el calentador cerca del microscopio por lo menos 15 minutos antes del uso.
2. Se determinó el desarrollo de los embriones y la etapa de Blastocisto.
3. Volver las placas a la incubadora.

Se determinaron las siguientes variables:

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

Para el análisis de los datos se utilizaron procedimientos de estadística descriptiva así como el soporte de hojas de Excel para la elaboración de cuadros y gráficos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Oocitos viables aspirados. Mediante la técnica de punción ovárica se aspiraron 69 ovarios obteniendo 444 oocitos, de los cuales 152 oocitos (34.23%) se clasificaron como degenerados por no presentar un desarrollo propicio de las células del *cumulus oophorus* o se encontraban sin ellas (desnudos); 292 oocitos (65.76%) fueron viables dando como promedio 4.2 oocitos viables por ovario (Cuadro 4; Figura 1).

El porcentaje de oocitos viables extraídos obtenidos son similares a los reportados por Cansino Arroyo *et al.* (2008) quienes con punción ovárica con jeringa obtuvieron 63.14% de oocitos viables y 36.89% de degenerados. Sin embargo, diferentes trabajos reportan tasas inferiores de oocitos viables, como el estudio realizado por Fernández *et al.* (1999) quienes obtuvieron 45.98% oocitos viables y 54.01% degenerados. Huanca *et al.* (2007) evaluaron el efecto de diferentes temperaturas de transporte (35 ° y 4 ° C) obteniendo una tasa de recuperación promedio de 60.7%. Por otro lado Fernández Reyes *et al.* (2010) recolectaron de 360 ovarios de cerdas, 670 oocitos viables representando 51.33%.

El promedio de oocitos viables por ovario fue superior a los encontrados por Gallegos de la Hoya (1998) quien reporta un promedio de 3.2. En comparación con Gordon (1994) quien obtiene promedios de 9, 5.4 y 9.8 los cuales son superiores a los encontrados, estas diferencias posiblemente se atribuyen a la raza de los animales, estado nutricional, aptitud y experiencia del operador.

Cuadro 4. Número de oocitos recuperados utilizando la técnica de aspiración ovárica.

Repetición	Ovarios aspirados	Oocitos extraídos	Oocitos viables	Oocitos degenerados	Promedio de oocitos viables por ovario
1	32	221	145 (65.61%)	76 (34.38%)	4.5
2	37	223	147 (65.92%)	76 (34.08%)	4.0
Total	69	444	292 (65.76%)	152 (34.23%)	4.2

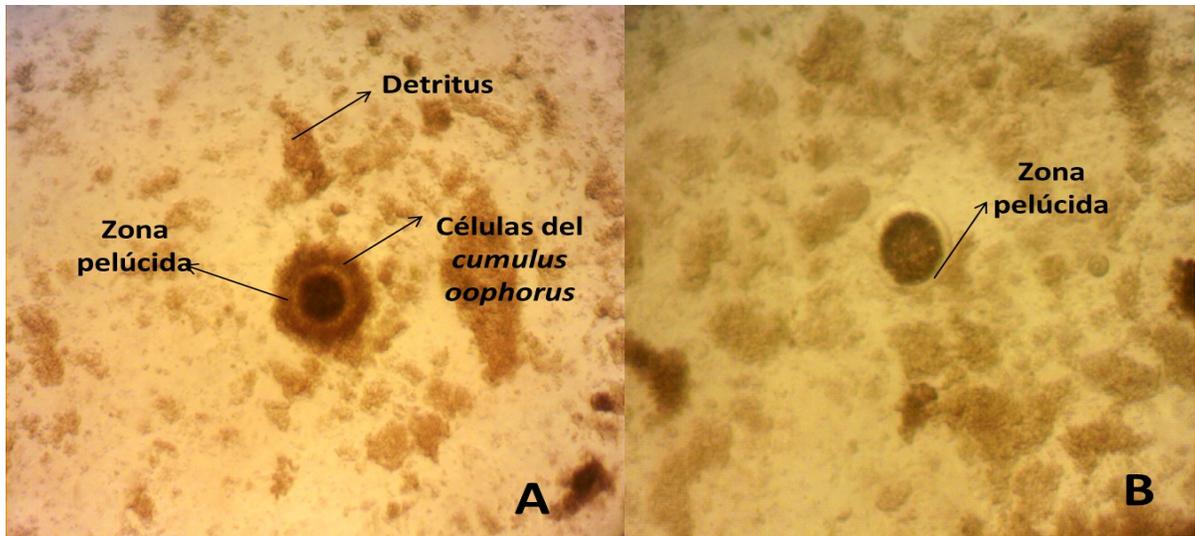


Figura 1. Oocitos obtenidos de la punción ovárica con sus estructuras. A) Oocito viable B) Oocito degenerado.

Porcentaje de maduración *in vitro*. Se colocaron a madurar 292 oocitos viables, de estos se seleccionaron 232 (79.45%) los que poseían un *cumulus oophorus* denso el cual cubría la superficie total del oocito con un citoplasma uniformemente granulado y oscuro, mientras que 60 oocitos (20.55%) no maduraron (Cuadro 5; Figura 2).

El porcentaje de oocitos madurados fue mayor que lo reportado por Fernández Reyes *et al.* (2010) quienes obtuvieron 32.1% de maduración en cerdas y un porcentaje de 67.8% no madurados, al igual que Cansino Arroyo *et al.* (2008) quienes comparan 3 sistemas de incubación: sistemas de incubación convencional (SIT), sistemas de incubación abierto (SIA) y sistemas de incubación cerrados (SIC); obteniendo un porcentaje de maduración de 74.93%, 74.68% y 69.87% respectivamente.

Sin embargo, Vásquez Araque *et al.* (2009) compararon dos métodos de incubación sobre la maduración *in vitro*; el primer método se realizó a condiciones de oxígeno del 5% obteniendo 79.18% de maduración, siendo este resultado similar al obtenido. El segundo método con oxígeno atmosférico del 20%, obtuvo 71.52% el cual es inferior comparado a lo obtenido en este estudio.

Cuadro 5. Porcentaje de Maduración *In Vitro* (MIV)

Repetición	Oocitos iniciales	Oocitos madurados	Oocitos no madurados
1	145	85.52% (124)	14.48% (21)
2	147	73.47% (108)	26.53% (39)
Total	292	79.45% (232)	20.55% (60)

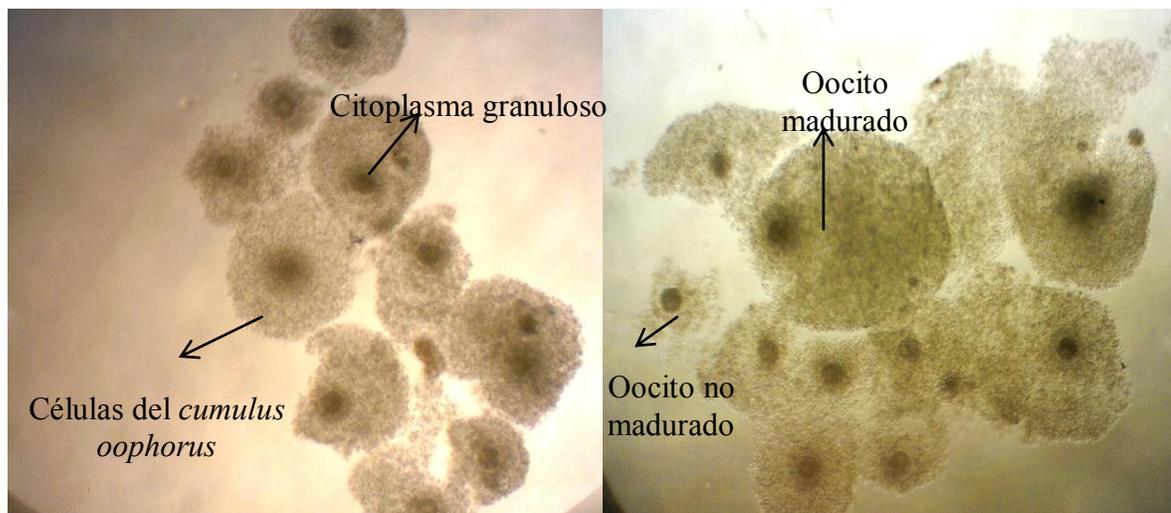


Figura 2. Oocitos obtenidos de maduración *in vitro*. A) Partes de un oocito madurado
B) Oocito madurado y no madurado

Porcentaje de oocitos fertilizados. De los 232 oocitos madurados se obtuvo un porcentaje de fecundación de 43.53% (101 oocitos) y 56.46% (131 oocitos) no fecundados en medio IVF-TALP (Cuadro 6; Figura 3). Casino Arroyo *et al.* (2008) obtuvieron una tasa de fertilización en el SIT de 42.48% en el SIA de 34.94% y 31.12 % en el SIC, siendo estos valores inferiores a los obtenidos. En contraste, Fernández *et al.* (1999) obtuvieron una tasa de fertilización del 70%, madurando los oocitos TCM- 199 suplementado con SFB, estradiol y hCG; este valor es el promedio de dos experimentos realizados: el primer grupo con ausencia de GnRH obtuvo 64% de fertilización y el segundo grupo con presencia de GnRH en el medio de maduración alcanzó un 75% de fertilización.

Fernández *et al.* (2007) realizaron tres ensayos de fertilización y cultivo de embriones *in vitro* reportando un promedio de fertilización de 73.3%. En este estudio también realizan la comparación de oocitos según su morfología, dividieron los oocitos en cuatro grupos según la presencia de células del *cumulus oophorus*; el primer grupo presentaba más de 6 capas de células del *cumulus oophorus*, el segundo grupo estaban rodeando de 4 a 6 células del *cumulus oophorus*, el tercer grupo estaba conformado por oocitos con 2 a 3 capas de células del *cumulus oophorus* y el grupo cuatro presentaba muy pocas células del *cumulus oophorus*. Los autores reportan un mayor porcentaje de fertilización en el grupo número dos con un 81.8%, seguido del grupo número tres con un 76.9% y un 72.2% para el grupo número uno. En este estudio se utilizó los grupos uno y dos según la presencia de células del *cumulus oophorus*.

Urrego *et al.* (2008) realizaron una comparación entre FIV convencional y FIV modificada obteniendo un promedio de 73.1% y 70.8%, respectivamente llegando a concluir que el porcentaje de oocitos fertilizados era similar entre las dos técnicas.

Estas diferencias posiblemente se deben a la calidad de ovarios trabajados ya que los autores antes mencionados trabajaron con OPU, mientras que en este estudio fueron ovarios de matadero provenientes de hembras de descarte además de que los autores utilizaron diferentes medios de fertilización.

Cuadro 6. Porcentaje de fertilización *in vitro* de oocitos bovinos.

Repetición	Oocitos maduros iniciales	Oocitos fecundados	Oocitos no fecundados
1	124	45.16% (56)	54.83% (68)
2	108	41.66% (45)	58.33% (63)
Total	232	43.53% (101)	56.46% (131)



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

Porcentaje de clivaje y apoptosis. Según la división celular embrionaria (clivaje) obtenida fue de 55.4% (56 oocitos) (Cuadro 7; Figura 4). López *et al.* (2007) midieron el efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones clivados a las 48 horas post inseminación de 37%, 32%, 31% y 43% siendo estos datos inferiores a los obtenidos.

Novoa *et al.* (2005) realizaron un experimento con ovarios de matadero sustituyendo productos biológicos en los medios de maduración por productos sintéticos y evaluaron el porcentaje de clivaje. Se realizaron cuatro tratamientos; Tratamiento 1: SOF, EGF 50 ng/mL, Tratamiento 2: SOF, FSH 0,1 UI/mL, LH 0,1 UI/mL, Surfactant 1 /mL, Tratamiento 3: SOF, EGF 50 ng/mL y Surfactant 1 /mL, T Tratamiento 4 (control) TCM-199, Suero Fetal Bovino (SFB) 10%, EGF 50 ng/mL.

El porcentaje de clivaje por tratamiento fue de 55.75%, 50.75%, 58.75% y 64% respectivamente. El Tratamiento 1 es similar a lo obtenido, sin embargo, el Tratamiento 2 es inferior y los tratamientos tres y cuatro son superiores a los encontrados. Por otra parte, Cansino Arroyo *et al.* (2008) obtuvieron 90.09% de embriones en clivaje valorados a las 24 horas del cultivo siendo este valor más alto a lo obtenido comparado con los autores antes mencionados.

La muerte celular (apoptosis) obtenida en este estudio fue de 44.5% (45 oocitos) (Cuadro 7; Figura 5). Mejía Isaza *et al.* (2009) compararon dos medios de cultivo de embriones: el KSOMaa y CR1aa obteniendo un porcentaje de apoptosis de 44% y 83%, estos valores son iguales y superiores respectivamente a los obtenidos en este estudio.

Sin embargo, Ahuja Aguirre *et al.* (2009) realizaron experimentos con dos medios de cultivo: un medio convencional para embriones bovinos (KSOM) y un medio de cultivo para producción *in vitro* de embriones humanos (HTF modificado), hallaron una tasa de división en el día tres post-FIV de 82.3% para embriones cultivados en KSOM y de 80.1% para embriones cultivados en HFT, estos valores son superiores a los encontrados; posiblemente estas diferencias se atribuyan a los medios utilizados.

Cuadro 7. Porcentaje de clivaje y apoptosis

Repetición	Número de oocitos fecundados	Oocitos en proceso de clivaje	Oocitos en proceso de apoptosis
1	56	58.9% (33)	41.1% (23)
2	45	51.1% (23)	48.8% (22)
Total	101	55.4% (56)	44.5% (45)

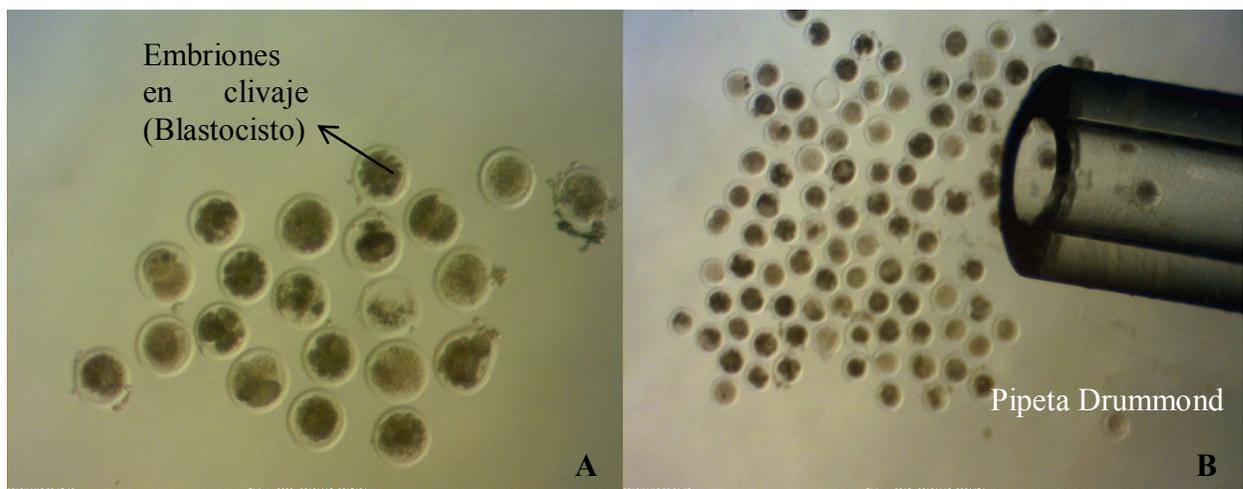


Figura 4. Embriones en clivaje obtenidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de la EAP Zamorano. A) Estados embrionarios de clivaje. B) Selección de blastocistos con la pipeta Drummond.



Figura 5. Imagen a los 5 días de cultivo en el fluido sintético del oviducto (SOF).

Porcentaje de blastocistos al séptimo día. Según el estado embrionario al séptimo día llamado blastocisto, se obtuvo 53.6% (30 blastocistos) (Cuadro 8, Figura 6). Mejía Isaza *et al.* (2009) obtuvieron un porcentaje de blastocistos de 0% y del 15% con el medio KSOMaa y el CR1aa respectivamente. Ahuja Aguirre *et al.* (2009) evaluaron el desarrollo embrionario a la etapa de blastocito obteniendo un 31.6% para embriones cultivados en el medio KSOM y 29.5% para embriones cultivados en HTF. Ratto *et al.* (1999) obtuvieron un porcentaje en desarrollo a blastocistos de 15.7% para los oocitos cultivados con células oviductuales y 0% de blastocisto en medio condicionado.

Fernández *et al.* (2007) realizaron tres ensayos de fertilización y cultivo de embriones *in vitro* reportando tasas de blastocisto de 0%, 2.6% y 2.1 % respectivamente, siendo estos valores inferiores de los autores antes descritos a comparación a los valores obtenidos a este estudio.

Cuadro 8. Porcentaje de blastocitos obtenidos al día siete.

Repetición	Oocitos en proceso de clivaje	Número de blastocistos
1	33	45.5% (15)
2	23	65.2% (15)
Total	56	53.6% (30)

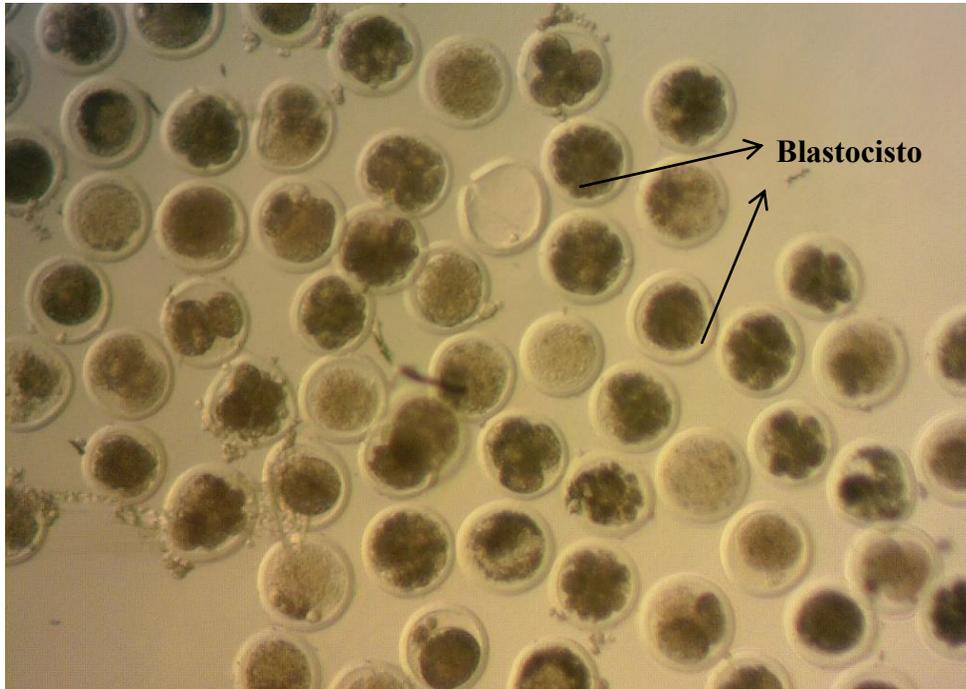


Figura 6. Blastocistos al día 7.

CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones del Laboratorio de Reproducción Animal de la EAP Zamorano y utilizando el protocolo de fertilización *in vitro* de bovinos propuesto por el Dr. Peter J. Hansen de la Universidad de Florida, USA., se obtuvo un mayor número de oocitos viables extraídos y un promedio de oocitos viables por ovario similar al de la literatura citada.
- La maduración *in vitro* presenta altos porcentajes comparado con otras investigaciones.
- Los porcentajes obtenidos de apoptosis son menores a los obtenidos por otros autores mientras que el porcentaje de clivaje es similar.
- La fertilización *in vitro* presenta un porcentaje menor en comparación de otros autores.
- El porcentaje de blastocistos al día siete es superior a lo encontrado con la literatura citada.

RECOMENDACIONES

- Utilizar embriones producidos mediante este protocolo en vacas receptoras para observar el porcentaje de implantación de los mismos.
- Realizar el protocolo con la técnica de aspiración folicular *in vivo* y compararla con la técnica de punción de ovarios de matadero.
- Comparar el protocolo con el uso diferente de semen de toros que son evaluados para FIV con semen utilizado en inseminación artificial.

LITERATURA CITADA

Ahuja Aguirre, C., F. Montiel Palacios, P. Pérez Hernández y J. Gallegos Sanchez. 2009. Medios alternativos para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical* 27(3): 277-284.

Cansino Arroyo, G., R. Flores Bello, J. Aguilar Cabrales, M. García Rodríguez y M. Álvarez Méndez. 2008. Producción *in vitro* de embriones bovinos bajo un sistema de incubación alternativa (en línea). Consultado el 28 de mayo de 2013. Disponible en: <http://www.archivos.ujat.mx/dip/divulgacion%20y%20video%20cientifico%202008/DA/CA/GCansinoA.pdf>

Fernández, A., Díaz, T., Muñoz, G. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista de la facultad de ciencias veterinarias* 48 (1): 51-60.

Fernández, A., P. Bastidas y J. Trocóniz. 1999. Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú *postmortem*. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 40 (2): 89-100.

Fernández Reyes, R., J.E. Hernández Pichardo y M. Reyes Flores. 2010. Maduración y fertilización *in vitro* de ovocitos de cerda obtenidos por punción y corte folicular. *Revista Salud Animal* 32 (2): 78-83.

Gallegos de la Hoya, P. 1998. Fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos. Tesis Ph.D. México, Universidad Autónoma de Nuevo León. 76 p.

Galli, C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi y G. Lazzari. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55(6): 1341-1357.

Gilchrist, R., J. Thompson. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 67: 6-15.

Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. Editorial CAB. Cambridge, Inglaterra. pp. 158- 180.

Herradón, P.G., L.A. Quintela, J.J. Becerra, S. Ruibal y M. Fernández. 2007. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 15(1): 34-41.

Huanca, W., J.M. Palomino, M. Cervantes, A. Cordero y T. Huanca. 2007. Efecto de temperaturas de transporte (35 °C, 4 °C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. Consultado el 26 de mayo de 2013. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/produccion_de_camelidos/reproduccion/133-Huanca-Ovocitos.pdf

Mejía Isaza, V., S. Arango Duque, A. Pareja Lopez, O. Camargo Rodriguez y R. Urrego Alvarez. 2009. Evaluación de dos medios de cultivos sobre la producción *in vitro* de embriones bovino. Revista CES de Medicina Veterinaria Zootecnia 4(2): 39-46

Liu, Z y Foote, R.H. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. Biology of Reproduction 53:786-790.

López, A., M. Olivera, T. Ruiz y A. Tarazona. 2007. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. Revista Medicina Veterinaria Zootecnia 12(2):1061-1067.

Lorenzo, P.L. 1994. Fecundación y desarrollo embrionario temprano. En: Reproducción de los animales domésticos. Cap. 6. Madrid: Ed. Aedos. p 182-187.

Madan, M.L. 2005. Animal biotechnology: applications and economic implication in developing countries. Revue Scientifique et Technique Office International Des Epizooties 24(1): 123-139.

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

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

Novoa, I.M., A. Aguirre, A. Moreno, M.A. Peña., J.A. Neira y C.I. Tibaitata-Corpoica. 2005. Efecto de la utilización de medios sintéticos o definidos en la maduración y fecundación de ovocitos bovinos *in vitro*. Revista Colombiana Ciencia Pecuaria 18(4): 340.

Quintana, M.D., P.E.C. Campos, P. Herrera, C. Gallego y E. Padrón. 2012. Comparación de dos métodos de recolección de ovocitos inmaduros para fertilización *in vitro* FIV obtenidos de hembras *Bubalus bubalis* enviadas a matadero. Revista de Salud Animal 34(1):53-56

Ratto, M., M. Berland, M. Wolter y R. Matamoros. 1999. Desarrollo de embriones de bovino obtenidos por fecundación *in vitro* cultivados con células oviductuales o medio condicionado y transferidos a hembras receptoras. *Archivo de Medicina Veterinaria* 31 (1): 89 – 96.

Ríos, J.R. 2001. Fundamentos de genética animal. Editorial Textos Universitarios, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México. p 255.

Ruane, J., M. Zimmermann. 2003. Estudio FAO investigación y tecnología: Biotecnología agrícola para países en desarrollo (en línea). Roma, FAO. Consultado 17 de mayo de 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/004/Y2729S/y2729s06.htm>

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

Urrego, R., A. Tarazona, M. Olivera y O. Camargo. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 21: 398-405.

Vásquez Araque, N., J. Gómez Oquendo, J.C. Álvarez Balvin y N.A. Chavarría. 2009. Comparación de dos métodos de incubación sobre la maduración de oocitos bovinos. *Revista Politécnica* ISSN 1900-2351 5(8): 26-32.

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

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 uno a tres miligramos 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 microcentrifuga 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 µL y almacenarlas a -20 °C en tubos del microcentrifuga de 1.5 mL indefinidamente.

Solución 8: Gentamicina. Diluir a 5 mg/mL, concentración en agua filtrar esterilizar. Medir con una pipeta poner de un mililitro 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 microcentrifuga y almacenarlos a -20 °C indefinidamente.

Solución 9: Mezcla de PHE. Prepare solución primaria de un µL 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 un mililitro 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: MgCl₂ para Percoll. Prepare la solución de 0.1 M agregando 0.203 g de MgCl₂ a 10 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °C indefinidamente.

Solución 13: CaCl₂ para Percoll. Preparar la solución de un Molar agregando 0.735 g CaCl₂+2H₂O 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 micras 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: NaHCO_3 . Disolver 1.052 g en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °C para una semana solamente.

Solución 20: PO_4 . Disolver 0.235 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estéril a 4 °C.

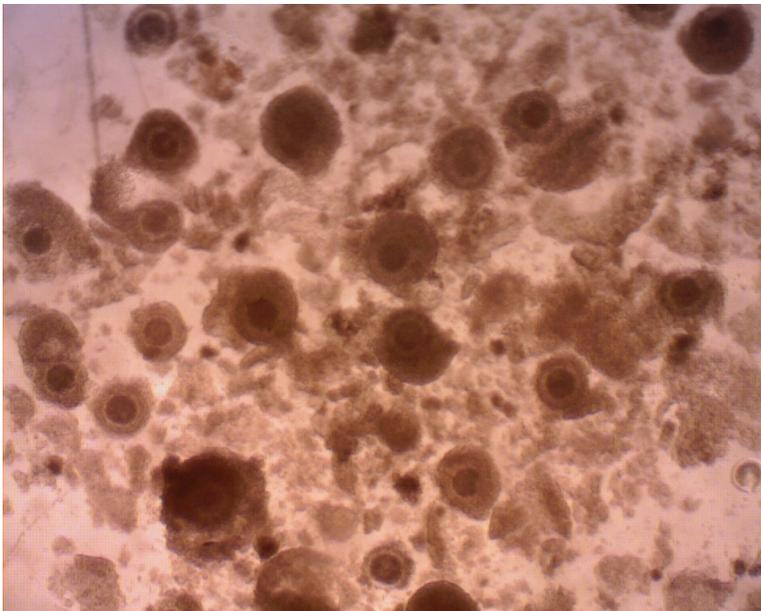
Solución 21: 1 M HEPES. Agregar 119 g de HEPES a 400 mL de agua. Ajustar el pH a 7.0 y ajustar el volumen hasta 500 mL. En un envase estéril filtrar y cubrir con el papel de aluminio; almacenar a 4 °C indefinidamente.

Solución 22: CaCl_2 para TL. Disolver 1.470 g $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua. Filtrar y almacenar estériles a 4 °C.

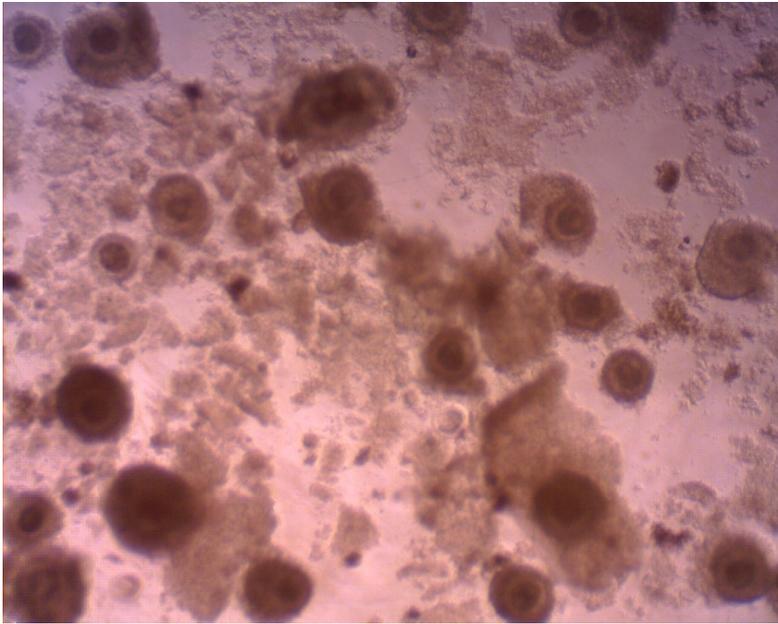
Solución 23: MgCl_2 para el TL. Disolver 1.017 g $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua. Filtrar/almacenar estéril a 4 °C.

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

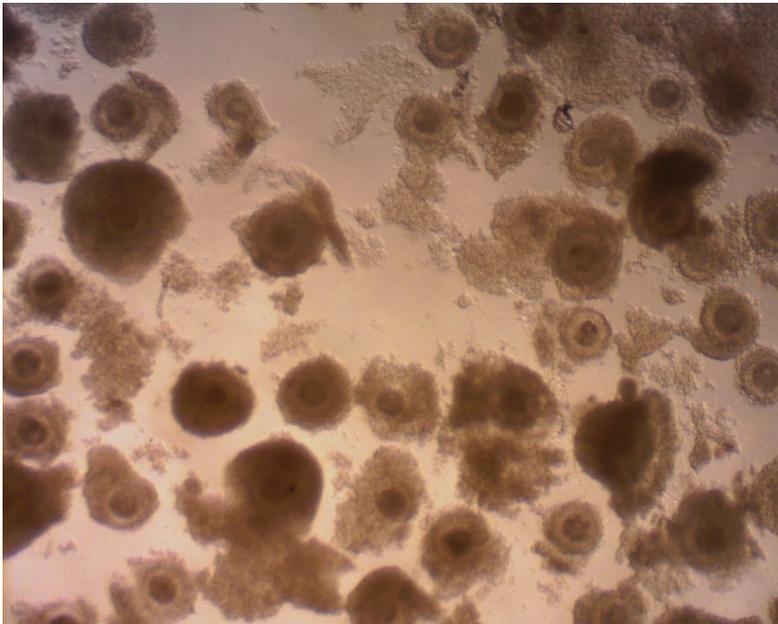
Solución 25: Glutamax. Disolver 0.434 g de ALA-Gln en 20 mL de agua sigma y esterilizar filtrando a 0.22 μm . hacer alícuotas de 600 μl en tubos eppendorf estériles y guardar a -20 C indefinidamente.



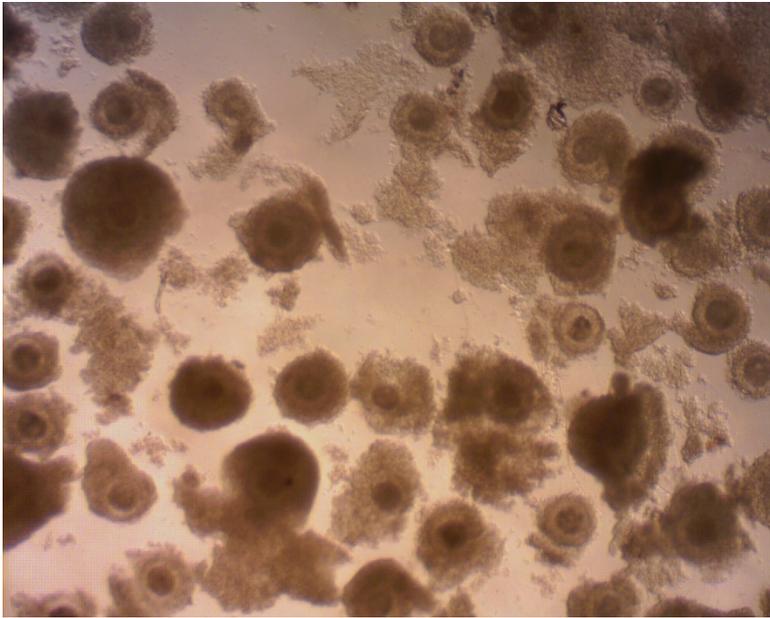
Anexo 2. Primer lavado de oocitos extraídos



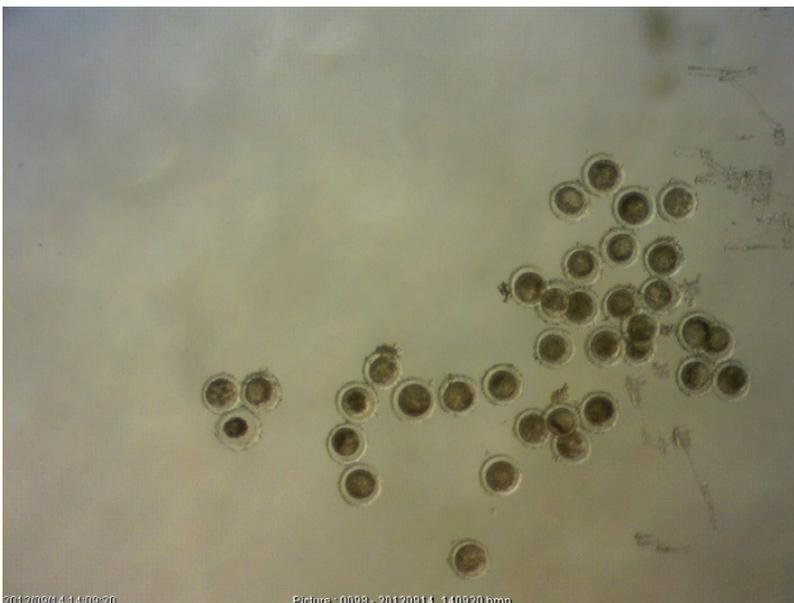
Anexo 3. Segundo lavado de oocitos extraídos



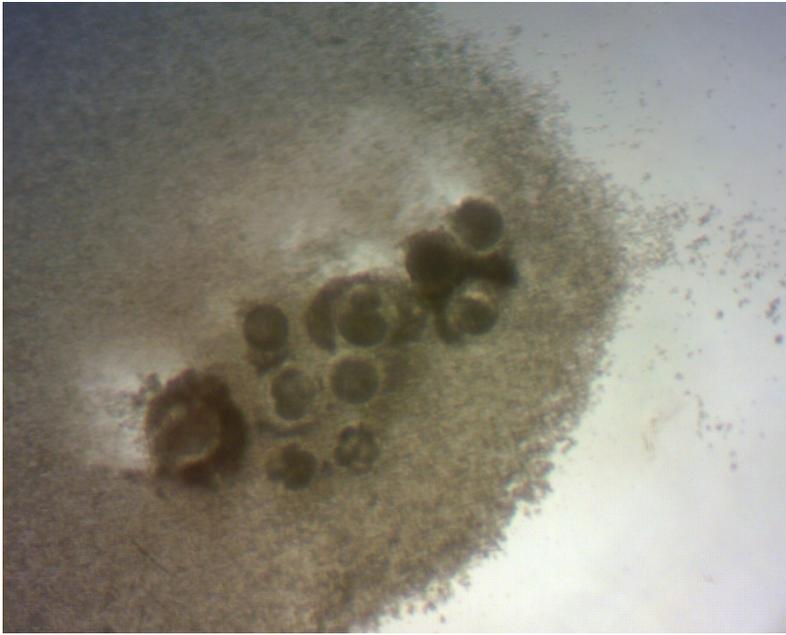
Anexo 4. Tercer lavado de oocitos extraídos



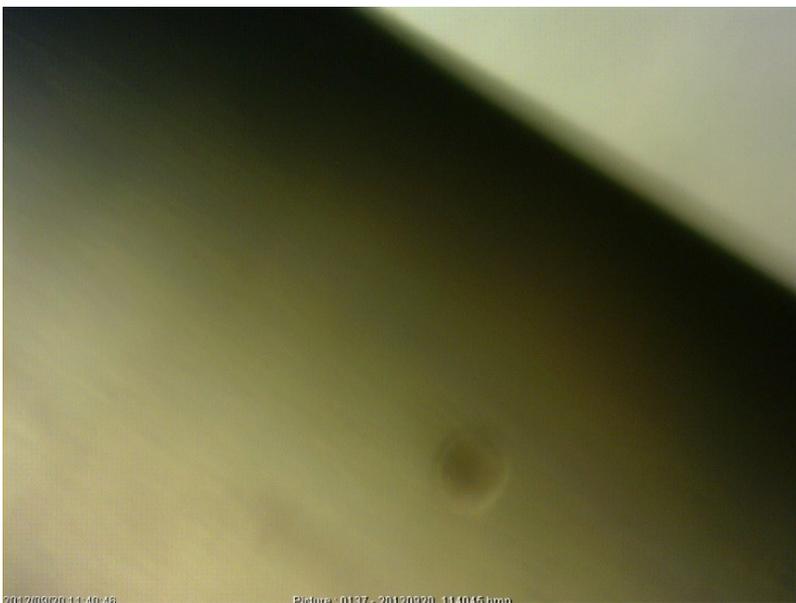
Anexo 5. Cuarto lavado de oocitos extraídos



Anexo 6. Cultivo de embriones al día 0



Anexo 7. Cultivo de embriones al día 5



Anexo 8. Embrión colocado en pajueta