

01669
32ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS PARA LA
CONGELACION DE EMBRIONES BOVINOS
DESARROLLADOS *IN VITRO*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL: REPRODUCCION

PRESENTADA POR

MVZ. JOSE RAMON MIER FERREIRA



DIRECTOR DE TESIS: DR. SALVADOR ROMO GARCIA

MEXICO, D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264839



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DECLARACION

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ.JOSE RAMON MIER FERREIRA

PENSAMIENTOS

“Vencer sin peligro es triunfar sin Gloria”

Cornelio

Hace falta una verdadera tormenta en la vida de la persona común y corriente, para hacerla comprender cuánto se ha preocupado por chubascos pasajeros

”La naturaleza de los hombres es siempre la misma; lo que los distingue son sus costumbres”

Confucio

Sólo el que alcanza su meta, conoce la íntima satisfacción de mirar hacia adelante.

DEDICATORIAS

A MI ESPOSA:

MARU: El ser más maravilloso que existe en el mundo, te agradezco tu gran Amor, Apoyo, Comprensión y Confianza. Por estar junto a mí en todo momento.

A MI HIJO:

JOSE RAMON: Razón de todos los esfuerzos y fuente de incontables alegrías. Por el amor que te tengo.

A MI PADRE:

JOSE RAMON: (Q.E.P.D.) Por su legado de vida y cuyo ejemplo siempre ha sido mi guía.

A MI MADRE:

VINDI: Por ser una Gran Madre y Amiga. Por haber sabido conducir y encauzar todas mis inquietudes, por haber dedicado gran parte de su vida a sus hijos de los cuales formo parte.

A MIS HERMANOS:

MARY CARMEN Y PEDRO: Por su cariño y apoyo a lo largo de toda mi vida. Por todos los momentos felices que pasamos juntos.

A MIS SUEGROS:

GONZALO Y JULIETA: Por su cariño y amistad incondicional que mucho me han ayudado en momentos difíciles.

A PATTY, IVONNE Y JAQUELINE: Por su confianza y respeto. Por la fuerza que me han dado para seguir adelante.

A LA FAMILIA ESPINOSA DE LA TORRE: Por toda la ayuda y consejos bien intencionados.

A LA FAMILIA ESPINOSA CALVO: Por haberme dado la oportunidad de aprender de Ustedes.

A LA FAMILIA BARRO PEREZ Y

A LA FAMILIA ZENDEJAS RUIZ: Por que con el paso de los años nuestra amistad se ha fortalecido cada día más.

A MIS AMIGOS:

NETO, QUIQUE, RAYMUNDO, TINO, ISMAEL, EMILIO: Quienes pese a la distancia participan en éxitos y fracasos.

A CAIFAN (Etelvina), CABEZON (Guillermo), SATO (Martínez) Y COCA (Irma): Por el ya tan conocido dicho "Cuanto más conozco a la gente, más quiero a mis perros".

A DIOS: Por no soltarme nunca de Su mano. Por permitirme llegar hasta aquí.

AGRADECIMIENTOS

AL DR. LUIS ZARCO: Por toda la ayuda y el apoyo incondicional que siempre me ha brindado durante mi formación profesional y por su invaluable amistad.

AL DR. SALVADOR ROMO: Porque sin sus consejos y ayuda no habría podido dar este salto.

A MI JURADO: Dr. Javier Valencia Méndez, Dr. Jorge Avila García, Dr. Carlos Galina Hidalgo, Dr. Miguel Betancourt Rule, Dr. Salvador Romo García. Por todo el apoyo brindado y sus aportaciones, que fueron de gran utilidad para la realización de éste trabajo

A VERO, CHEPO, VICTOR, MIGUEL, MALI: Por su gran amistad y compañerismo. Por estar siempre en disposición de ayudarme.

A JAVIER HERNANDEZ Y ABNER GUTIERREZ: Por su amistad y disponibilidad para que éste trabajo se pudiera realizar con éxito.

A LOS MIEMBROS DEL DEPARTAMENTO DE REPRODUCCION: Dr. Luis Zarco, Dr. Joel Hernández, Dr. Javier Valencia, Dr. Antonio Porras, Dra. Rosa Páramo, Dr. Everardo González, Dr. Salvador Romo, Dr. Carlos Galina, MPA. Carlos Esquivel, MPA. Adriana Saharrea, MPA. Miriam Boeta, MPA. Alberto Balcázar, MPA. Octavio Mejía, MPA. Salvador Morales, MVZ. Verónica Caballero, MVZ. José Luis Cerbón, MVZ. Susana Rojas, MVZ. Clara Murcia, Biol. Gerardo Perera, MVZ. Javier Hernández, MVZ. Abner Gutiérrez, MVZ. Lucia Rangel, MVZ. Arantza Lassala, MVZ. Xochitl Hernández, MVZ. Julio Cervantes, MVZ. Enrique Pérez, MVZ. Pilar Benítez, MVZ. Sandra Salgado, Miguel Cuevas, Víctor Martínez, Malinalli Ledezma, Gisel García, Mariana y Tofita Bernal. Ya que de todos ustedes aprendí algo útil para mi formación profesional y para mi vida personal.

A LA FMVZ Y LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO: Por su colaboración y apoyo. Por darme la oportunidad de ser profesionista.

A LA DGAPA: Por facilitarme el apoyo económico de la beca para la realización de mis estudios de Maestría.

A LA DGAPA: Por los recursos económicos recibidos a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica en el proyecto No. IN303793.

TABLA DE CONTENIDO

Portada	I
Declaración	II
Pensamientos	III
Dedicatorias	IV
Agradecimientos	VI
Tabla de Contenido	VII
Lista de Figuras	IX
Lista de Cuadros	IX
Resumen	1
Summary	2
I.- Introducción	3
II.- Revisión de Literatura	7
2.1 Obtención de Ovocitos	7
2.2 Selección de Ovocitos	8
2.3 Maduración <i>in vitro</i>	8
2.4 Fertilización <i>in vitro</i>	11
2.5 Desarrollo <i>in vitro</i>	15
2.6 Congelación de Embriones	16
2.7 Transferencia de Embriones	20
III.- Material y Métodos	22
3.1 Localización	22
3.2 Colección de Ovarios	22
3.3 Obtención y Clasificación de los Ovocitos	22
3.4 Maduración <i>in vitro</i> de Ovocitos	24
3.5 Colección de las Células de la Granulosa	25
3.6 Fertilización <i>in vitro</i> de Ovocitos	26
3.7 Cultivo <i>in vitro</i> de Embriones	27
3.8 Congelación y Descongelación de los Embriones Producidos <i>in vitro</i>	28
3.8.1 Congelación	29
3.8.2 Descongelación	31
3.9 Desarrollo <i>in vitro</i> de Embriones Post-Descongelación	32
3.10 Transferencia de Embriones Post-Descongelación	33
IV.- Análisis Estadístico	35
V.- Resultados	36
5.1 Grupo 1: Embriones Descongelados y Transferidos	36
5.2 Grupo 2: Embriones Descongelados y Desarrollados <i>in vitro</i>	37
VI.- Discusión	41
6.1 Transporte de ovocitos	41
6.2 Obtención y clasificación de los ovocitos	41
6.3 Maduración <i>in vitro</i> de Ovocitos	43
6.4 Fertilización <i>in vitro</i> de Ovocitos	44
6.5 Cultivo <i>in vitro</i> de Embriones	45
6.6 Congelación y Descongelación de los Embriones Producidos <i>in vitro</i>	46
VII.- Conclusiones	50
VIII.- Literatura Citada	51

IX.- Anexo: Preparación de Medios	67
9.1 Solución salina 0.9%	68
9.2 Penicilina/Estreptomicina	68
9.3 TL-Hepes	68
9.4 Medio de maduración	69
9.5 Tripan azul	69
9.6 Medio de desarrollo	69
9.7 Medio de fertilización	70
9.8 Percoll 90%	71
9.9 Percoll 45%	72
9.10 Sperm-TL	73
9.11 Penicilamina-Hipotaurina-Epinefrina	74
9.12 Heparina	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Congeladora manual y semiautomática (Diseñada por Robertson, E.).	62
2	Identificación de las pajillas utilizadas para la congelación de embriones, según lo establecido por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS)	63
3	Empajillado de embriones en glicerol al 1.4 M (10%)	64
4	Empajillado de embriones en etilén glicol al 1.5 M	64
5	Armado de la pistola para la transferencia de embriones	65
6	Sitio de colocación del embrión en el útero, durante la transferencia de embriones por la técnica no quirúrgica	66

LISTA DE CUADROS

CUADRO	TITULO	PAGINA
1	Número total y promedio de ovocitos colectados	37
2	Número total y porcentaje de ovocitos madurados <i>in vitro</i>	38
3	Número total y porcentaje de ovocitos fertilizados <i>in vitro</i>	38
4	Número total y porcentaje de embriones desarrollados <i>in vitro</i> , según la etapa de desarrollo alcanzada	39
5	Número de embriones congelados, según la etapa de desarrollo alcanzada y crioprotector utilizado	39
6	Nacimientos logrados de los embriones transferidos, según la etapa de desarrollo alcanzada y crioprotector utilizado	40
7	Total y porcentaje de embriones desarrollados <i>in vitro</i> post-descongelación, según la etapa de desarrollo alcanzada y crioprotector utilizado	40

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la viabilidad de los embriones bovinos producidos *in vitro*, congelados con dos diferentes agentes crioprotectores. Se obtuvieron 214 ovarios de vacas sacrificadas en rastro de los cuales se seleccionaron 1597 ovocitos que se sometieron a las técnicas de maduración, fertilización y desarrollo *in vitro*, obteniéndose al final de este procedimiento 89 embriones, los que se asignaron a dos grupos. En el primer grupo se congelaron 25 embriones utilizando una solución al 10% de glicerol como agente crioprotector (grupo testigo) y en el segundo grupo se congelaron 64 embriones utilizando una solución al 1.5 M de etilén glicol (grupo experimental). Una vez descongelados, la remoción del glicerol se hizo en 3 pasos. Una vez evaluados, 11 embriones del grupo testigo se transfirieron por el método no quirúrgico. En el caso de los embriones del grupo experimental se transfirieron directamente 25 embriones a vacas receptoras, sin realizarse la evaluación post-descongelación. El diagnóstico de gestación se realizó el día 21 post-transferencia únicamente en las vacas que no repitieron estro. Esto se realizó por medio de radioinmunoanálisis (RIA) de progesterona en sangre. El diagnóstico se confirmó el día 65 de gestación por medio de ultrasonido de tiempo real. Los embriones restantes de ambos grupos: 39 del grupo experimental y 14 del grupo testigo se descongelaron y posteriormente se desarrollaron *in vitro*. Del total de embriones transferidos del grupo experimental se obtuvieron 2 partos (8%); mientras que de los embriones del grupo testigo, no se obtuvo ninguno (0%). No se encontró diferencia estadística entre grupos ($P > 0.05$). Del total de embriones del grupo experimental, 27 embriones se desarrollaron *in vitro* (69.23%), mientras que los embriones del grupo testigo, desarrollaron 5 (35.71%), sin encontrarse diferencia estadística entre grupos ($P > 0.05$). Los resultados indican que el etilén glicol puede ser utilizado para la congelación de embriones producidos *in vitro*.

FERTILIZACION IN VITRO CONGELACION EMBRIONES BOVINOS FIV

SUMMARY

The objective of this study was to determine the post-thaw viability of *in vitro*-derived cattle embryos frozen with two different cryoprotectants. A total of 214 ovaries were obtained from slaughtered cows. Of these, 1597 oocytes were selected for *in vitro* maturation, fertilization and development. At the end of the procedure, 89 embryos were obtained. These were frozen in two groups. In the first group, 25 embryos were frozen using a 10% glycerol solution as a cryoprotectant (control group) and in the second group 64 embryos were frozen using a 1.5 M solution of ethylene glycol (test group). From the control group, once the embryos were thawed, glycerol was removed in 3 steps. Once evaluated, 11 embryos were transferred by the non-surgical method. In the test group, 25 embryos were thawed and transferred non-surgically in a direct mode to recipient cows without post-thaw evaluation. Pregnancy diagnosis was performed on day 21 post-transfer only in the cows that did not repeat heat. This was performed by means of radioimmunoassay (RIA) of progesterone in blood. Diagnosis was confirmed on day 65 of gestation by real-time ultrasound. The rest of the embryos in both groups: 39 of the test group and 14 of the control group were thawed and then cultured and evaluated for development *in vitro*. From the embryos transferred of the test group, 2 calvings were obtained (8%). From the embryos in the control group, no calvings were produced (0%). These results were not statistically different ($P > 0.05$). From the embryos cultured, 27 embryos from the test group developed *in vitro* (69.23%), while only 5 embryos from the control group developed *in vitro* (35.71%) without finding a statistical difference between groups ($P > 0.05$). The results obtained in this work indicate that ethylene glycol can be used to freeze *in vitro* derived embryos.

IN VITRO FERTILIZATION FROZEN EMBRYOS CATTLE IVF

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS PARA LA CONGELACION DE EMBRIONES BOVINOS DESARROLLADOS *IN VITRO*

J.- INTRODUCCION

La congelación de embriones tiene como objetivo detener el estadio de desarrollo de los embriones sin afectar su viabilidad, por lo que éste método permite su conservación durante períodos de tiempo variables para después, previa descongelación, transferirlos a hembras receptoras para que continúen normalmente su desarrollo (44,112,116).

Actualmente la congelación de embriones forma parte integral de los programas de transferencia embrionaria (27,110,118), gracias al progreso que se ha tenido en esta área, la congelación también facilita y abarata los costos de transportación de material genético tanto en el ámbito nacional como internacional. Además, el transporte de embriones congelados reduce el riesgo de transmitir ciertas enfermedades en comparación con el transporte de animales vivos (17,82,110).

La congelación de embriones también ayuda a evitar la dependencia en la disponibilidad de receptoras sincronizadas que se produce cuando se lleva a cabo un programa de transferencia de embriones convencional (110,116), debido a que para lograr una gestación es necesario la sincronía entre el embrión y el endometrio (48,46).

Hasta la fecha, se han realizado diversos trabajos acerca de la congelación de embriones bovinos producidos *in vitro* (97,119,121).

Existe evidencia de que los embriones producidos por medio de la técnica de fertilización *in vitro* pueden ser congelados y descongelados de forma similar a los embriones que se obtienen *in vivo* (27,36,97,99). Sin embargo, los embriones producidos por la técnica de fertilización *in vitro* son más sensibles a la congelación que los embriones producidos *in vivo*, a pesar de que se encuentren en el mismo estadio de desarrollo (48,99).

Reinders (103) menciona que una posible causa de esta sensibilidad, es que en la evaluación de los embriones producidos *in vitro* se sobrestima la calidad de estos, ya que se les considera como excelentes o buenos siendo que sólo son de buena o regular calidad.

Se han desarrollado algunas técnicas para la criopreservación y mantenimiento a bajas temperaturas de los embriones producidos *in vitro*, lográndose en 1987 el primer nacimiento de un becerro desarrollado a partir de un embrión congelado producido por la técnica de fertilización *in vitro* (36).

Desde entonces ha habido un gran progreso en los métodos de congelación y descongelación de embriones producidos *in vitro*, demostrando lo importante que es la calidad (47,116) y la etapa de desarrollo (19,47,116) del embrión que se va a congelar. Esto se debe a que no todos los embriones que son obtenidos son aptos para ser congelados (116), por lo que las técnicas de congelación de embriones se han enfocado a los estadios embrionarios de mórula y blastocisto (16,44,99).

Algunas razones para esto son:

- 1.- Que los cromosomas están activados durante la fase de maduración y por lo tanto el proceso de congelamiento les causa un severo daño (106).

- 2.- Que los estadios embrionarios tempranos contienen gran cantidad de inclusiones vesiculares, las cuales son dañadas con el proceso de congelación (86,124).

3.- Que la permeabilidad de la membrana hacia los crioprotectores está íntimamente relacionada con la capacidad de desarrollo después de su descongelación (61).

Por estas razones, es posible que los embriones colectados en estadios más tempranos de desarrollo, sobrevivan menos a la congelación y a la descongelación (86).

Es bien sabido que los embriones no pueden sobrevivir a temperaturas por debajo de los -20°C sin la presencia de un agente crioprotector (91,110,111). Los crioprotectores son sustancias que aumentan la supervivencia de la célula después de la congelación, disminuyendo el daño celular durante el proceso de criopreservación (111,112).

Dentro de los criterios recomendados para utilizar un crioprotector se incluyen: Alta solubilidad, baja toxicidad en altas concentraciones y un bajo peso molecular para una penetración más fácil. El glicerol y el etilén glicol, pertenecen a los crioprotectores clasificados como permeables o intracelulares (91,110,112).

El glicerol es uno de los crioprotectores que más se ha utilizado en la congelación comercial de embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro*, ya que permite obtener un elevado porcentaje de viabilidad. Sin embargo, tiene la desventaja de que posteriormente a la descongelación hay que exponer el embrión al paso en varias soluciones con concentraciones descendentes de glicerol para su remoción, así como para su rehidratación, con lo que se consume mucho tiempo (42,130).

Recientemente el etilén glicol se ha utilizado como crioprotector en la conservación de embriones bovinos. El peso molecular de este agente (62.07), es menor que el del glicerol (92.10) y que el de algunas otras sustancias que se han utilizado como crioprotectores, como son el propilén glicol (76.10) y el sulfóxido de dimetilo (DMSO) (78.13) (44).

Por esto su penetración así como su eliminación se lleva a cabo en un menor tiempo, reduciendo con esto la toxicidad embrionaria, además de que no se requiere su remoción para la transferencia de los embriones a vacas receptoras (18,62,122,123) ni su evaluación microscópica, lo cual tiene una gran ventaja en la descongelación y transferencia de embriones.

El objetivo de éste trabajo es evaluar al etilén glicol como agente crioprotector de embriones bovinos producidos por fertilización *in vitro*, comparándolo con el glicerol, que es el agente comúnmente utilizado para éste propósito.

JJ- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 OBTENCIÓN DE OVOCITOS

Existen varias formas para obtener los ovocitos a partir de los ovarios colectados en el rastro:

La más común es la aspiración directa de los folículos (26,95). Este procedimiento se puede realizar utilizando una jeringa de 5 ml y una aguja calibre 18 (13,54,126).

Otra de las formas usuales es la de la disección del ovario por medio de una hoja de bisturí o una navaja de rasurar (14,77,84). La ventaja de la utilización de la aspiración es la rapidez con la que se pueden obtener un gran número de ovocitos (43,75,107), las desventajas son que sólo una parte de los ovocitos que hay en los folículos son aspirados y que no todos los ovocitos que se recuperan pueden ser utilizados para su maduración ya que una parte de los mismos no tienen adheridas las células del cumulus por lo que no se consideran de buena calidad (64,75).

La desventaja de la disección, es que es un procedimiento muy tardado ya que lleva mucho tiempo el poder cortar y lavar toda la superficie del ovario. Su ventaja radica en que se obtiene una gran cantidad de ovocitos, la mayoría de estos de buena calidad (14,64,75).

Se ha informado que para obtener una mayor cantidad de ovocitos de los ovarios se pueden combinar ambas técnicas, realizando primeramente la aspiración y posteriormente la disección del ovario (107,136). También se ha encontrado que el promedio de ovocitos recuperados por la técnica de aspiración es de 10-16 ovocitos por ovario (11,75,107) mientras que por la técnica de disección se han recuperado de 16-21 ovocitos por ovario (15,75,107).

Además se ha encontrado que con la técnica de aspiración entre el 45-78% de los ovocitos son de calidad aceptable para su procesamiento *in vitro* (64,75), mientras que por disección es de 72-83% (15,64,75).

2.2 SELECCION DE OVOCITOS

El tamaño de los folículos ováricos está relacionado con la calidad de los ovocitos para su maduración, por lo que lo más recomendable es utilizar los ovocitos obtenidos de los folículos que tengan un diámetro entre 2 y 7 mm, ya que estos proporcionan un buen porcentaje de desarrollo (32,41,60).

La clasificación más empleada en la actualidad es la que propuso De Loos y col en 1989 (25), ya que evalúa la compactación y transparencia de las células del cumulus que revisten al ovocito, así como la homogeneidad y transparencia del citoplasma, clasificándolos en 4 categorías.

Los ovocitos que tienen mayor posibilidad de transformarse en embriones son los de categoría 1 y 2, cuyas características morfológicas son un citoplasma homogéneo, así como la presencia de varias capas de células del cumulus compactadas y bien adheridas alrededor de éste (52,53,84).

Los de las categorías 3 y 4, tienen el citoplasma picnótico, con pocas o ninguna capa de células del cumulus adheridas al ovocito, por lo que su posibilidad de alcanzar su desarrollo hasta embrión es menor (22,51,97).

2.3 MADURACION IN VITRO

El primer investigador que pudo madurar ovocitos extrafoliculares bovinos *in vitro* fue Edwards en 1965 (31) desde entonces el desarrollo en ésta técnica ha sido notable (48,76).

Algunos investigadores han utilizado células del cumulus (36,77) o de la granulosa (78,117) como co-cultivos en los medios de maduración *in vitro*, estas células secretan ciertas sustancias que favorecen la maduración normal del ovocito, incrementando el porcentaje de fertilización y el grado de desarrollo embrionario (36,77,78,117).

Existe evidencia en la literatura que afirma que las gonadotropinas (11,147), los esteroides (54) y algunos factores celulares (68) interactúan para proporcionar las condiciones esenciales durante la maduración del ovocito (11,54,68,147).

Chian y Niwa (21,22), demostraron que es necesaria la presencia de las células del cumulus intactas en el ovocito por lo menos durante las primeras 12 horas de la maduración citoplasmática, además de que Yang y Lu (145) obtuvieron un mayor porcentaje de desarrollo hasta la etapa de blastocisto en ovocitos con las células del cumulus intactas. Sin embargo, Hawk y col (51) observaron que los ovocitos bovinos seleccionados pueden conservar su potencial de desarrollo al ser liberados de las células del cumulus antes de la maduración *in vitro*. Las células del cumulus son consideradas como un subtipo de las células de la granulosa y conservan algunas de las propiedades fisiológicas de estas células, incluyendo la secreción de esteroides (101).

Las células de la granulosa aparentemente mejoran la adquisición de la competencia en el desarrollo del ovocito (37,114,117).

Por el contrario, algunos autores argumentan que estas células secretan factores inhibidores de la meiosis y que disminuyen el porcentaje de maduración de ovocitos *in vitro*, así como también el desarrollo embrionario (68,117).

Sin embargo, en trabajos recientes en donde se ha utilizado este tipo de células como co-cultivo en el medio de maduración *in vitro* se han obtenido excelentes resultados en la producción de blastocistos (42,141,143).

Existen trabajos que han descrito la morfología del ovocito bovino posterior a la maduración *in vitro*, siendo la ideal la de un ovocito con una masa de células del cumulus expandidas y claras; después de la fertilización *in vitro* los ovocitos con éstas características muestran una alta proporción en el desarrollo embrionario en comparación a los ovocitos desprovistos de éstas células o de aquellos que presentaron las células del cumulus compactadas (11,44,52).

Prokofiev (101) concluye con base en el rendimiento de embriones obtenidos, que el rango de tiempo en la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos es entre 18 y 24 horas, pero Monaghan (87) obtuvo mejores resultados con 24 horas de maduración.

Existe cierta flexibilidad en el tiempo de maduración, ya que se ha encontrado que con 18 horas de maduración *in vitro* los resultados en el porcentaje de fertilización y en el desarrollo embrionario son similares que si se mantienen 24 horas (44).

Monaghan (87) no encontró diferencia significativa en la proporción de la división celular entre las 18 y las 24 horas en la maduración *in vitro*, pero la producción de blastocistos fue más alta en el período de 24 horas.

En la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos se realizan cambios bien definidos en las células del cumulus que los rodean, éstas células presentan una masa esférica en tres dimensiones y el ovocito da la apariencia de estar flotando en el medio de maduración (55).

La evaluación visual de la expansión de las células del cumulus después de la maduración *in vitro* no indica que los ovocitos hayan alcanzado la etapa de metafase II (88).

La evaluación de los ovocitos bovinos durante la maduración *in vitro* no se puede confirmar por la evaluación morfológica.

Por esto se han desarrollado técnicas específicas para evaluar la maduración nuclear y citoplasmática (88,107). Rose y Bavister (105), al igual que Moor y Trounson (88) sugieren que para asegurar una maduración *in vitro* normal del ovocito, se requiere observar la capacidad de desarrollo del embrión.

Wang (133) demostró que una atmósfera de 5% de CO₂ es la mejor para el desarrollo de embriones bovinos desarrollados *in vitro*, por lo que las condiciones de uso común que requieren los gametos, tanto masculinos como femeninos, dentro de la incubadora son: 39°C de temperatura, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa (22,24,143). El ovocito es muy sensible a los cambios de temperatura, por ello se recomienda que su manipulación dentro del laboratorio se realice a una temperatura entre 25 y 30°C (144). Otro factor que se debe de tomar en cuenta es el agua empleada para la preparación de los medios utilizados en este proceso, ésta debe estar libre de sales y minerales, así como de contaminantes, ya que cualquiera de estos pudiera alterar las propiedades de las sustancias que son utilizadas (44,46).

2.4 FERTILIZACION IN VITRO

La fertilización *in vitro* se puede definir como un proceso de interacción controlada entre ovocitos y espermatozoides en medios de cultivo con el objeto de obtener embriones viables (24).

Algunos de los usos más importantes de la fertilización *in vitro* son:

- 1) Producir grandes cantidades de embriones para su comercialización (24).
- 2) Desarrollar embriones de un valor genético superior para la obtención de animales destinados a la producción (24,89,129).

3) Obtener embriones en grandes cantidades para utilizarse en diversas tecnologías como son el sexado (16,79), clonación (3,134,140) y la ingeniería genética (43,67).

Esta técnica, se inició principalmente en mamíferos de laboratorio (12,20), por lo que los avances obtenidos en especies domésticas de interés comercial son muy recientes, además de que las metodologías utilizadas no están completamente estandarizadas (66,135).

En 1977, Iritani y Niwa (60) lograron la primera fertilización *in vitro* de ovocitos bovinos. Posteriormente en 1984, Brackett (10) logró el nacimiento del primer becerro por fertilización *in vitro* a partir de un ovocito ovulado *in vivo* y fertilizado *in vitro*. Pero no fue hasta 1987 que Lu y col (77) pudieron obtener una de las primeras gestaciones producidas totalmente *in vitro* utilizando las células del oviducto como co-cultivo.

La técnica de fertilización *in vitro* en ganado bovino se basa en la obtención de un gran número de ovocitos de una vaca (43). Para que ésta técnica se pueda lograr, se han descrito diferentes procedimientos que son de suma importancia y que hay que tomar en cuenta para los eventos que se deben reproducir *in vitro*, entre ellos se encuentran: La maduración de los ovocitos (13,52), la motilidad (71) y la concentración de los espermatozoides (73), la capacitación espermática (96,113), la fertilización de los ovocitos (2,65), el cultivo (53) y co-cultivo (33,113) para el desarrollo de los embriones hasta un estadio en el cual puedan ser transferidos en fresco a un vientre receptor (42) o para su almacenamiento mediante congelación (123).

Estos procedimientos difieren fundamentalmente en el grado de complejidad de los medios y técnicas de cultivo empleadas en la fertilización *in vitro* (1,53).

Sin embargo, la principal limitante en el desarrollo de ésta técnica, es que los ovarios obtenidos de rastro son de baja calidad genética, por lo que su utilización se ve reducida, salvo ejemplo de razas puras recuperables al sacrificio (128,129).

Para obtener una alta proporción de espermatozoides móviles, el semen se puede someter a: 1) Lavado por medio de centrifugación con dos gradientes de concentración de Percoll, obteniendo con esto la separación de los espermatozoides motiles de los inmóviles (27,65,81). 2) La técnica de Swim-up, la cual favorece la obtención de una capa de espermatozoides libre de contaminantes y con una alta motilidad (10,71,77). 3) Empleo de varios agentes químicos en los medios de fertilización *in vitro*, dando con esto un incremento considerable en la motilidad espermática y un aumento en la frecuencia de penetración en los ovocitos (2,4,36,83); los agentes más empleados son la cafeína y el que es una mezcla de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) (2,14,48,84).

Las concentraciones de semen utilizadas en la fertilización *in vitro* en el ganado bovino varían de 0.5 a 5 millones de espermatozoides por ml (11,65,96,119), lo que se puede expresar en una relación ovocito-espermatozoide de 1:10000-20000 (52,81,147).

Ling (73) encontró que la concentración espermática no afecta el porcentaje de desarrollo, pero la cantidad de blastocistos disminuye si la concentración espermática es mayor a 1.6 millones de espermatozoides por ml, lo cual puede deberse a la poliespermia.

También se deben de tomar en cuenta los procedimientos para la capacitación espermática, los cuales tienen como objetivo simular los eventos que ocurren normalmente en el aparato reproductor de la hembra.

De los diferentes métodos que se han evaluado para inducir la capacitación espermática en bovinos en la fertilización *in vitro*, el que ha recibido más atención es el empleo de los glicosaminoglicanos (GAGS), sustancias que se encuentran en el fluido del oviducto de la vaca en estro. Dentro de esta familia de sustancias, la más empleada es la heparina (26,32,69).

Otra sustancia que se incluye rutinariamente en los medios de capacitación es la albúmina sérica bovina (BSA), la cual tiene un efecto benéfico en la capacitación *in vitro* de los espermatozoides (36,113).

Fukui (38,40) considera que las células del cumulus son necesarias en la fertilización *in vitro* para maximizar la incidencia de la reacción acrosomal, incrementándose de esta manera el porcentaje de ovocitos fertilizados.

Hawk y col (52) demostraron que el desprendimiento de las células del cumulus del ovocito antes de la fertilización *in vitro* incrementa la proporción de ovocitos fertilizados.

Algunos investigadores proponen que el tiempo de exposición de los espermatozoides con los ovocitos para la fertilización *in vitro* puede variar de 16 hasta 24 horas (54,77,87), sin embargo se ha determinado que el tiempo óptimo de incubación para lograr un mayor porcentaje de ovocitos fertilizados es de 24 horas (87).

Las anormalidades más comunes que se presentan en la fertilización *in vitro* son la poliespermia y la partenogénesis, ambas son propiciadas por los diferentes tratamientos para inducir la capacitación espermática *in vitro*. Chikamatsu (123) observó que existe una mayor incidencia de poliespermia cuando el medio de capacitación contiene cafeína o ionóforos que cuando se utiliza heparina.

Se sabe que la partenogénesis en los ovocitos de bovino no es frecuente, ya que esta descrito en la literatura que los porcentajes van de 0 a 6% (39,60,71), a diferencia de lo que sucede en otros vertebrados (44,46).

Hyttel (59) encontró que el tiempo requerido para que el espermatozoide penetre en el ovocito durante la fertilización *in vitro* es menor de 4 horas.

Una vez realizados estos procesos ambos gametos se encuentran en condiciones de interactuar bajo condiciones controladas para llevar a cabo la fecundación y comenzar el desarrollo de la división embrionaria, que concluirá al cabo de 7-9 días después de la fertilización *in vitro* con la obtención de una mórula o un blastocisto como producto final del proceso (118,126).

Brackett en 1982 (9) fue el primero en lograr el nacimiento de un becerro obtenido totalmente por medio de fertilización *in vitro*.

2.5 DESARROLLO *IN VITRO*

Con el propósito de propiciar el microambiente requerido para favorecer el desarrollo de los embriones producidos *in vitro*, se ha investigado el empleo de diferentes tipos de células como co-cultivo (33,36,142).

Algunos autores han empleado células epiteliales del oviducto bovino (BOEC) (33,39,142), logrando que los embriones lleguen hasta la etapa de blastocisto, otros lo han logrado utilizando células de hígado de rata Búfalo (BRLC) (50,127,131) y algunos otros lo han hecho con células de la granulosa (37,85,113).

Generalmente los ovocitos se conservan en el medio de cultivo por un período de 7-9 días, para que los embriones se desarrollen hasta la etapa de mórula o de blastocisto (24,44,95). Las divisiones celulares del embrión se realizan en tiempos muy similares a los observados *in vivo* (44,46).

El criterio empleado para la evaluación de los embriones producidos *in vitro*, tiene como referencia las características observadas en los embriones *in vivo*, obtenidos por superovulación (34,44).

Existen diversos trabajos donde se mencionan las diferencias que presentan los embriones producidos *in vitro* contra los *in vivo*, y coinciden en afirmar que los embriones obtenidos *in vitro* presentan los blastómeros con una coloración más obscura que los embriones producidos *in vivo* (45,125).

Las etapas de desarrollo del embrión bovino como sucede *in vivo*, han sido exhaustivamente estudiadas, encontrándose que después de la etapa de cigoto los embriones experimentan varias divisiones mitóticas. El cigoto o etapa de una célula, es bastante grande y tiene una baja proporción núcleo/citoplasma. Para alcanzar una proporción similar a las células somáticas experimenta divisiones celulares sin aumento de la masa celular, a este proceso se le llama segmentación (46). La primera división se puede observar alrededor de las 30 horas y la segunda a las 40-42 horas posteriores a la inseminación (44,98).

Las divisiones de segmentación son siempre mitóticas y por ello cada blastómero (célula hija) recibe el juego completo de cromosomas. Estas divisiones iniciales suelen ocurrir al mismo tiempo en todos los blastómeros, pero la sincronización se pierde inevitablemente y los blastómeros comienzan a dividirse de manera independiente entre sí (46).

2.6 CONGELACION DE EMBRIONES

La congelación es un complejo proceso físico-químico de transporte de calor y agua entre la célula y el medio que la rodea (46,111).

El principio biológico de la criopreservación de embriones está caracterizado por su capacidad de disminuir de forma reversible todos los procesos metabólicos que tienen lugar en las células, interrumpiendo la embriogénesis por períodos prolongados sin afectar su viabilidad (44,112,116).

La muerte durante el proceso de congelación es atribuida a la reducción del volumen de la célula por debajo de un límite crítico, donde la deshidratación osmótica provoca un estrés que origina una pérdida de lípidos en la membrana celular (44,111).

Whittingham en 1971 (137), realizó la primera congelación de un embrión de mamífero, el cual fue hecho en ratones. Wilmut y Rowson en 1973 (139) fueron los primeros en demostrar que los embriones de ganado bovino pueden sobrevivir a la congelación.

Las técnicas para la criopreservación y el mantenimiento de los embriones producidos *in vivo* a bajas temperaturas se han ido desarrollando en gran medida para diferentes especies de mamíferos, así tenemos que éstas prácticas se han realizado exitosamente en ratas (138), ratones (137), conejos (115), borregos (82), cabras (92), gatos (30), cerdos (63), caballos (57,58) y en ganado bovino (28,139).

El desarrollo que se pueda obtener en la congelación de los embriones producidos *in vitro* es muy importante para el avance en la aplicación comercial de esta técnica (44,46).

La congelación de embriones producidos *in vitro* se ha podido desarrollar en ganado bovino (81,113,126), informándose en el año de 1990 el nacimiento en 1987 de los primeros becerros producidos por ésta técnica, congelados y descongelados en glicerol (36).

Los crioprotectores intracelulares protegen a las células de los efectos dañinos de la alta concentración de soluto producido en el medio exterior durante la congelación (110,112).

Los mecanismos de acción de los crioprotectores no están bien entendidos, sin embargo, los efectos protectores de estas sustancias pudieran ser (91,112):

1.- Disminuir la temperatura a la cual ocurre la congelación intracelular.

2.- Estabilizar las membranas celulares para reducir el daño durante la congelación y descongelación.

3.- Reducir la formación de hielo intracelular.

En todo el mundo se han desarrollado una gran variedad de técnicas para la congelación de embriones producidos *in vitro*. Existen trabajos donde se compara la eficacia de la congelación utilizando diferentes concentraciones (118,121) y diferentes combinaciones de crioprotectores (35,97,122,123), por lo que el desarrollo y adaptación de esta técnica, podría emplearse para aumentar la población de ganado bovino en poco tiempo, de forma económica y eficiente. (104,118).

En la descongelación de embriones producidos *in vitro*, es decir, en los procesos para su rehidratación, también se han descrito diferentes técnicas. Así tenemos que existen procedimientos de transferencia directa (81) o los que contemplan uno (26,81,113,118), dos (35) o más pasos consecutivos (41,48) para lograr la rehidratación de los embriones, causándoles el menor daño posible.

Las tasas de supervivencia de los embriones bovinos fertilizados *in vitro*, congelados y descongelados son afectadas al igual que en los embriones obtenidos *in vivo*, por el grado de calidad (116), el estadio de desarrollo (47), el crioprotector utilizado (18), el método de agregación del crioprotector y su remoción (19), así como el método de congelación empleado (62).

La facilidad para transferir embriones directamente en las hembras receptoras después de su descongelación facilita el comercio de embriones, ya que estos se pueden producir en grandes cantidades por medio de la producción *in vitro* (130).

El glicerol es el crioprotector que más se ha utilizado en la congelación comercial de embriones bovinos obtenidos *in vivo* o producidos por fertilización *in vitro*, ya que permite obtener un elevado porcentaje de viabilidad (16,26,97).

Su desventaja radica en el tiempo que se emplea para eliminarlo de la célula, ya que posteriormente a la descongelación hay que exponer el embrión en varios pases de soluciones con concentraciones descendentes de glicerol para su rehidratación, además se tiene que observar al microscopio y colocar en otra pajilla para su transferencia a un vientre receptor (130).

Esto origina problemas de organización cuando se tienen que descongelar y transferir una gran cantidad de embriones en un sólo día. Por el contrario, cuando sólo se requiere descongelar y transferir unos cuantos embriones se pierde mucho tiempo en el proceso de rehidratación (130).

El que los embriones no requieran de un complejo proceso de rehidratación para su transferencia, permite que cada embrión sea descongelado y rehidratado con un mínimo de tiempo y equipo, ya que no se necesita un laboratorio para llevar a cabo este procedimiento (130).

Voelkel y Hu (130,131) encontraron que el etilén glicol es un crioprotector efectivo para los embriones de bovino producidos *in vivo*, además de que permite su rehidratación directamente en el medio de transferencia.

Leibo y Loskutoff (70) encontraron que el porcentaje de supervivencia de los embriones producidos *in vitro*, congelados en etilén glicol fue casi igual a los embriones producidos *in vivo* pero congelados en glicerol, el cual es el crioprotector tradicionalmente empleado en la congelación de embriones *in vivo*.

También el porcentaje de preñez ha sido más alto utilizando etilén glicol que con el uso de otros agentes crioprotectores, además de que los efectos tóxicos del etilén glicol asociados con la congelación son menores (118).

El dominio que se obtenga en el desarrollo de la técnica de producción de embriones *in vitro* congelados y descongelados con un proceso simple de rehidratación, aunado a la transferencia de embriones puede crear un amplio mercado en donde los propietarios de ranchos puedan comprar embriones congelados para su transferencia directa, en forma similar a la que se hace hoy en día con el semen congelado (44,130).

2.7 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La transferencia de embriones se puede definir como la técnica por medio de la cual los embriones obtenidos por colección de una hembra donadora o por fertilización *in vitro* son colocados en el útero de otra hembra de la misma especie, la cual funciona como madre sustituta, en donde el embrión continúa su desarrollo hasta su nacimiento.

La primera transferencia de embriones que se hizo con éxito fue en 1890 por Walter Heape en conejos y la primera transferencia en bovinos se informó en la Unión Soviética en 1951 (Citado por 80).

El desarrollo de la transferencia de embriones junto con la fertilización *in vitro* han dado como resultado el nacimiento de becerros (10,35,48,76), lo que ha permitido acelerar el proceso de mejoramiento genético de un hato reduciendo el intervalo generacional (74).

Existen tres técnicas para la transferencia de embriones, de las cuales dos son quirúrgicas y una no quirúrgica.

La primera técnica que se utilizó fue hecha por laparotomía media ventral la cual involucra anestesia general del animal receptor, por lo que se requiere de preparar quirúrgicamente la zona de la línea media justo antes de la glándula mamaria.

Además se tiene que realizar invasión de la cavidad abdominal para lo cual se requiere de instalaciones, equipo y personal altamente calificado, por lo que en la actualidad sólo se utiliza con fines de investigación (80).

La otra técnica quirúrgica se realiza por medio de laparotomía por uno de los flancos del animal, para lo cual se necesitan realizar bloqueos epidurales, paravertebrales y regionales, por lo que se puede realizar en clínicas de campo; la principal desventaja al igual que la técnica anterior es que se necesita personal calificado y equipo de cirugía para poder realizarla (80).

La tercera y la más utilizada actualmente es la técnica de transferencia no quirúrgica o transcervical, ya que con ésta técnica no se requiere de instalaciones y material especial, además de que no se expone a la receptora a ningún tipo de cirugía, por lo que se puede realizar a nivel de campo. Dentro de sus mayores ventajas se pueden contar que tiene un menor costo que las anteriores, además de que el tiempo requerido para realizarla es muy corto. La desventaja más común que se encuentra con esta técnica es que existen animales en los cuales es muy difícil poder atravesar el cérvix y en algunas ocasiones prácticamente imposible (80).

III.- MATERIAL Y METODOS

3.1 LOCALIZACION

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fertilización In Vitro del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.2 COLECCION DE OVARIOS

Los ovarios se obtuvieron de vacas sacrificadas en rastros del Estado de México (Tlanepantla, Temamatla y Cerro Gordo), sin importar la raza, edad, condición corporal, ni el estado reproductivo de los animales.

Una vez sacrificado el animal, se obtuvieron los ovarios y se colocaron dentro de bolsas de plástico con cierre hermético conteniendo Solución Salina Fisiológica (SSF) al 0.9% (ANEXO-9.1) adicionada con 1% de penicilina-estreptomina (P-E) (41,122) (ANEXO-9.2). Posteriormente las bolsas con los ovarios se colocaron dentro de un termo y se transportaron al laboratorio, a una temperatura ambiente promedio de 25-30°C (24,51,77). El tiempo que se empleó desde la muerte del animal hasta su procesamiento en el laboratorio fue de 90 a 180 minutos, lo cual se encuentra dentro de los límites de tiempo utilizados por otros autores (22,51,144).

3.3 OBTENCION Y CLASIFICACION DE LOS OVOCITOS

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados dos veces con solución salina fisiológica a una temperatura de 25-30°C (24,51,77).

Los ovocitos se colectaron de los folículos que medían entre 2-7 mm de diámetro, por medio del método de aspiración y posteriormente por disección del ovario (107,136). La aspiración se realizó con una jeringa hipodérmica de plástico (Air-Tite) de 5 ml y una aguja calibre 18 con una longitud de 1.5 pulgadas (13,60,121). Una vez lavados los ovarios se secaron con una toalla de papel absorbente. Se tomó al ovario con una mano, procediendo a la punción de los folículos con la jeringa sostenida en la otra mano. La punción y aspiración del líquido folicular se realizó desde el interior del ovario evitando que la aguja rompiera la pared externa del folículo, lo cual previene la pérdida de los ovocitos con la salida del líquido folicular (44). Al concluir la aspiración de todos los ovarios, el líquido se colocó en tubos cónicos de plástico de 50 ml dejándose reposar durante 15 minutos para permitir la sedimentación de los ovocitos (24,52,53).

La disección del ovario se realizó posterior a la aspiración, para este procedimiento se tomó a cada ovario individualmente con una pinza y con una hoja de bisturí sostenida con otra pinza se realizaron los cortes en toda la superficie del ovario (excepto los folículos mayores a 7 mm y los cuerpos lúteos), la superficie de los cortes hechos se lavó con solución TL-HEPES (5) (ANEXO-9.3) a una temperatura de 25-30°C (77,121), empleando para esto una jeringa hipodérmica de plástico de 5 ml y una aguja calibre 18 con una longitud de 1.5 pulgadas (14,54,122), a fin de colectar los ovocitos.

El sedimento obtenido de la aspiración, así como el líquido obtenido del lavado se colocaron en cajas de Petri y los ovocitos fueron localizados bajo un microscopio estereoscópico a un aumento de 20-60x, en el interior de una campana de flujo laminar (9,24).

Los ovocitos se seleccionaron para su cultivo, asegurándose de su calidad en base a su apariencia morfológica y la cantidad de capas de células del cumulus adheridas en su contorno (24,81,84). Sólo los ovocitos que tuvieron intacta la zona pelúcida y que estaban rodeados por dos o más capas de células del cumulus compactas y que tenían el citoplasma finamente granulado y homogéneo se utilizaron para el proceso de maduración (22,24,41). Esto quiere decir que sólo se utilizaron los ovocitos de categoría 1 y 2 según la clasificación de De Loos (25).

Para la manipulación de los ovarios se utilizaron guantes estériles de látex, así como ropa limpia y apropiada para evitar la contaminación, tanto del personal como de los medios de cultivo. Además, todo el material que se empleó durante las diferentes etapas del manejo se encontraba estéril.

3.4 MADURACION IN VITRO DE OVOCITOS

Los ovocitos seleccionados para el proceso de maduración *in vitro*, se lavaron dos veces con solución TL-HEPES a una temperatura de 25-30°C (26,52).

Una vez lavados, se colocaron en una caja de cultivo de 4 pozos (Nunc well), que contenía 500 microlitros (μ l) del medio de maduración (48) (ANEXO-9.4), depositándose de 20 a 30 ovocitos en cada uno de los pozos (24).

El medio utilizado para la maduración *in vitro* fue equilibrado dentro de la incubadora 2 horas antes de colocar los ovocitos en el mismo (14,36).

La caja de cultivo con los ovocitos se colocó dentro de una incubadora con la finalidad de que las condiciones ambientales fueran constantes.

Para su maduración, los ovocitos se mantuvieron por un período de 24 horas a una temperatura de 39°C, con una atmósfera gaseosa de 5% de CO₂ y con una humedad relativa del 100% (14,22,36,54).

3.5 COLECCION DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA

Al mismo tiempo que se seleccionaron los ovocitos para su maduración, se preparó la monocapa de co-cultivo con células de la granulosa, las cuales son necesarias para este paso y para el del desarrollo in vitro de los embriones (37,85).

Las células de la granulosa se obtuvieron a partir del sedimento obtenido del líquido folicular aspirado (53,72,117). Para su lavado las células se colocaron en un tubo cónico de plástico de 15 ml (para centrífuga) con medio de maduración y se centrifugaron 3 veces a 300 g durante 10 minutos (72,117).

El sobrenadante se eliminó y el paquete conteniendo las células de la granulosa se resuspendió en 500 µl del medio de maduración. Posteriormente se procedió a observar su viabilidad por medio de tinción en una solución de tripan azul (76) (ANEXO-9.5) y finalmente se calculó su concentración por medio del hemocitómetro de Spencer (72). En cada uno de los pozos con los ovocitos, se colocaron 1×10^6 células (117).

Estas mismas células se utilizaron para desarrollar la monocapa de co-cultivo que posteriormente sería utilizada en la etapa de desarrollo in vitro de los embriones.

Para este paso se resuspendieron 1×10^6 células en 500 µl del medio de desarrollo (48) (ANEXO-9.6) en otra caja de 4 pozos que se colocó dentro de la incubadora con las condiciones descritas anteriormente (117).

El medio de desarrollo de estas células se reemplazó a las 48 horas con medio nuevo el cual fue previamente equilibrado dentro de la incubadora por un período de 2 horas (14).

3.6 FERTILIZACION *IN VITRO* DE OVOCITOS

Después de 24 horas en el medio de maduración, los ovocitos se evaluaron en el microscopio estereoscópico a un aumento de 40-60x para observar la expansión de las células del cumulus (9,24). Los ovocitos con células expandidas se sometieron a la técnica de fertilización *in vitro*. La cual se realizó en cajas de cultivo de 4 pozos, conteniendo 500 µl del medio de fertilización (6) (ANEXO-9.7), el cual fue equilibrado por 2 horas incubándose en las condiciones ya descritas (14).

Antes de ser transferidos a la caja con el medio de fertilización, los ovocitos se lavaron dos veces en este mismo medio.

Para realizar la fertilización *in vitro*, se utilizó semen congelado, proveniente de un toro de fertilidad probada. La pajilla se descongeló en baño María a 35°C por 30 segundos (32,44).

Una vez descongelado el semen se procedió a evaluar su motilidad progresiva en un microscopio óptico, midiendo el porcentaje de motilidad (96). Sólo las muestras que tenían 50% o más de motilidad fueron utilizadas (71).

Para separar los espermatozoides vivos de los muertos, el semen se colocó en un tubo cónico de plástico de 15 ml conteniendo dos gradientes de concentración de Percoll: 90% (ANEXO-9.8) y 45% (ANEXO-9.9) y se centrifugó a 700 g por 30 minutos (48,65).

Una vez terminada la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el paquete con los espermatozoides se resuspendió en 250 μ l de medio SPERM-TL (96) (ANEXO-9.10), a una temperatura de 37°C y un pH de 7.4. A continuación se procedió a calcular su concentración por medio del método del hemocitómetro de Spencer (35,48).

Posteriormente en cada uno de los 4 pozos de la caja de cultivo que contenía 500 μ l del medio de fertilización, se colocaron de 20 a 30 ovocitos expandidos y se les adicionaron 1×10^6 espermatozoides, 20 μ l de PHE (84) (ANEXO-9.11) y 20 μ l de heparina (48,84,129) (ANEXO-9.12). La caja se colocó dentro de la incubadora por 24 horas (41), para posteriormente realizar el cultivo *in vitro* de los embriones.

Como en los pasos anteriores el medio utilizado se equilibró dentro de la incubadora por un período de 2 horas antes de realizar la fertilización *in vitro* (14).

3.7 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES

El cultivo *in vitro* de los embriones se realizó en una caja de 4 pozos, cada uno de los cuáles contenía 500 μ l de medio de desarrollo y la monocapa de células de la granulosa como co-cultivo que se preparó 72 horas antes (14).

Después de 24 horas en el medio de fertilización y antes de ser colocados en el medio de desarrollo, los embriones fueron removidos y se lavaron 2 veces con este medio para eliminar los espermatozoides (44). En esta etapa de desarrollo, permanecieron de 7 a 9 días, reemplazando la mitad del medio cada 48 horas (24,41).

Al final de este proceso, se evaluó el grado de desarrollo y calidad que alcanzaron los embriones, según el número de divisiones que tenían en ese momento (24), de acuerdo a la técnica descrita por Dorn y Kraemer (29) para embriones

obtenidos *in vivo*, separando las mórulas y blastocistos para someterlos a la técnica de congelación de embriones.

Este procedimiento se realizó con un microscopio estereoscópico a un aumento de 40-60x en la campana de flujo laminar (9,24).

3.8 CONGELACION Y DESCONGELACION DE LOS EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO*

Después de 7 a 9 días en cultivo, sólo los embriones que se encontraron en estadio de mórula y blastocisto fueron puestos en una caja de Petri, en la cual se colocaron 100 µl de medio para transferencia de embriones (BIOLIFE, AGTECH INC. #CAT. C15), el cual se encontraba a una temperatura de 25-30°C (18,19,26).

Para la congelación de los embriones se utilizó una congeladora manual y semiautomática diseñada por Robertson, la cual se basa en un vaso de Dewar de cuello ancho y de aspecto cromado (plateado), el cual se llenó con nitrógeno líquido y un segundo vaso de Dewar (cristal), al cual se le agregaron 500 ml de etanol absoluto y que se sumergió en el nitrógeno líquido contenido en el primer vaso (Figura 1).

Este vaso de cristal tiene una doble pared entre la cual hay un espacio sellado al vacío, lo que permite que el descenso de la temperatura del etanol sea lento, manteniendo el ritmo de congelación deseado. Además, se utilizó una bomba eléctrica para burbujear aire al alcohol etílico y así homogeneizar su temperatura dentro del vaso de cristal.

La temperatura se controló con la ayuda de dos termómetros digitales, los cuales tenían la capacidad de medir un rango de temperatura de 300°C a -45°C; éstos fueron colocados dentro del vaso de cristal.

El empleo de los dos termómetros fue para prevenir la falla de alguno de ellos, ya que una vez iniciado el procedimiento de congelación, éste no puede suspenderse, pues causaría daño a los embriones.

Por medio de una pinza se fijó en el interior del vaso de cristal la manguera de la bomba de aire y el polo de cada uno de los dos termómetros. Estos polos se colocaron a la misma altura que se encontraban los embriones dentro de las pajillas.

El ritmo de descenso de la temperatura se pudo ajustar de diferentes formas: 1) Incrementando o disminuyendo la cantidad de etanol en el vaso de cristal; 2) Sumergiendo o sacando el vaso de cristal del vaso plateado o 3) Incrementando o disminuyendo la cantidad de aire inyectada por la bomba dentro del etanol.

3.8.1 Congelación

1.- Los embriones se lavaron 7 veces en el medio para transferencia de embriones, a temperatura ambiente de 25-30°C (18,26,97).

2.- Se procedió a evaluar los embriones en el microscopio estereoscópico a un aumento de 40-60x, los cuales se encontraban en el medio descrito anteriormente, para determinar y calificar su grado de calidad y de desarrollo (9,24).

3.- Posteriormente se formaron 2 grupos experimentales. El primer grupo de embriones fue congelado utilizando glicerol como agente crioprotector (grupo testigo) y el segundo fue congelado utilizando etilén glicol (grupo experimental).

4.- Los embriones del grupo testigo, se expusieron a una solución al 1.4 M (10%) de glicerol (AGTECH INC. #CAT. C17) por 10 minutos a temperatura ambiente de 25-30°C para estabilizarlos (26,36).

5.- Los embriones del grupo experimental, se expusieron a una solución 1.5 M de etilén glicol (AGTECH INC. #CAT. C18) por 10 minutos a temperatura ambiente de 25-30°C para estabilizarlos (19,113).

6.- Posteriormente, los embriones de ambos grupos se colocaron individualmente en pajillas francesas de plástico de 0.25 ml (36,113) previamente identificadas según lo establecido en el Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS). (Figura 2)

El llenado de las pajillas se hizo de la siguiente manera, dependiendo del crioprotector utilizado.

A) Para el grupo testigo (glicerol): Se aspiró una columna de glicerol de 3.5 cm, después se colocó una burbuja de aire de 1 cm. Posteriormente se aspiró otra columna de 4 cm de glicerol con el embrión, seguido de otra burbuja de aire igual a la anterior y al final otra columna de glicerol del mismo tamaño que la primera (97). (Figura 3)

B) Para el grupo experimental (etilén glicol): Se aspiró una columna del medio de transferencia de embriones de 2.5 cm, después se dejó una burbuja de aire de 1 cm. Posteriormente se colocó otra columna del medio de transferencia del mismo tamaño que la anterior y otra burbuja de aire de 1 cm. Enseguida se aspiró una columna de 2.5 cm de etilén glicol al 1.5 M con el embrión, seguido se colocó otra burbuja de aire del mismo tamaño que las anteriores y al final otra columna del medio de transferencia igual a las dos primeras (8). (Figura 4)

7.- Una vez terminado el procedimiento anterior, las pajillas se sellaron con alcohol polivinílico y se marcaron con diferente color dependiendo el estado de desarrollo del embrión, esto se hizo para facilitar el manejo y la identificación de los embriones en el momento de la descongelación (116). Finalmente se procedió a bajar la temperatura.

8.- Las pajillas con los embriones se colocaron durante dos minutos directamente en la congeladora para que los embriones dentro de las pajillas se equilibraran a la misma temperatura (-7°C). Después de 2 minutos, se indujo la cristalización del medio en forma manual, colocando unas pinzas metálicas previamente enfriadas con nitrógeno líquido sobre la marca de la pajilla en un punto alejado del embrión y a nivel del menisco (35). Después de verificar que todas las pajillas se habían cristalizado, se mantuvo la temperatura de -7°C por 10 minutos (8,19,36,113).

Posteriormente la temperatura se bajó paulatinamente a un ritmo de -0.3 a -0.5°C por minuto, hasta llegar a los -35°C (8,36,113).

9.- Por último, al alcanzar la temperatura de -35°C , las pajillas se sacaron de la congeladora y se introdujeron directamente en nitrógeno líquido para almacenarse en un termo a -196°C (8,36,110,113).

3.8.2 Descongelación

1.- Inmediatamente después de sacarse del termo con nitrógeno líquido, las pajillas se mantuvieron al aire por 10 segundos a una temperatura de $25-30^{\circ}\text{C}$ y después se colocaron en baño María a 35°C , hasta que se descongelaron (20 segundos) (8,49). Con este procedimiento se evita que la zona pelúcida del embrión se rompa y por lo tanto aumenta la viabilidad de los embriones mejorando la fertilidad (102).

2.- La remoción del glicerol para rehidratar los embriones del grupo testigo, se hizo en 3 pasos. En cada uno de ellos, los embriones permanecieron en el medio indicado por 5 minutos a una temperatura de $25-30^{\circ}\text{C}$ (41).

A) Los embriones se colocaron en una solución de 6% de glicerol más 10.3% de sacarosa (AGTECH INC. #CAT. C19).

B) Después los embriones se colocaron en una solución de 3% de glicerol más 10.3% de sacarosa (AGTECH INC. #CAT C19).

C) Posteriormente los embriones se colocaron en una solución libre de glicerol con 10.3% de sacarosa (AGTECH INC. #CAT. C19).

D) Por ultimo los embriones se colocaron en el medio de transferencia de embriones.

3.- Los embriones del grupo experimental (etilén glicol), se colocaron directamente en el medio de transferencia de embriones, a temperatura de 25-30°C.

4.- Para la evaluación post-descongelación de los embriones de ambos grupos, éstos permanecieron en el medio de transferencia de embriones, a una temperatura de 25-30°C.

Una vez descongelados, se procedió a observarlos al microscopio estereoscópico a un aumento de 40-60x (9,24), para evaluar su grado de calidad y desarrollo. Lo anterior se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Dorn y Kraemer (29) para embriones producidos *in vivo*.

3.9 DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES POST-DESCONGELACION

Posteriormente a la evaluación, los embriones se cultivaron por 24 horas en el medio de desarrollo con células de la granulosa como co-cultivo. Las condiciones de cultivo fueron: Temperatura de 39°C, humedad relativa de 100% y una atmósfera de 5% de CO₂, como ha sido descrito (22,113,143).

Una vez transcurrido éste período de incubación, los embriones se colocaron en medio de transferencia de embriones, a una temperatura de 25-30°C y se procedió a realizar su evaluación microscópica, contabilizando los porcentajes de embriones normales o con cambios degenerativos aparentes.

Se consideró como un embrión viable, aquel que tenía evidencia de haber avanzado en su desarrollo (97), es decir, los que se encontraban en estadio de mórula y lograron pasar a blastocisto, así como los estadios de blastocisto que lograron eclosionar.

3.10 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES POST-DESCONGELACION

Previa palpación rectal de la vaca receptora para localizar el ovario que presentó cuerpo lúteo, se procedió a rasurar, lavar y desinfectar la región comprendida entre la penúltima vértebra sacra y la quinta coccígea.

Posteriormente se administró una dosis de 0.5-0.7 ml de propiopromacina (combelen) por vía endovenosa para tranquilizar al animal y otra de 4-6 ml de procaína al 2% por vía epidural, para eliminar los movimientos peristálticos del recto. Posteriormente se lavó con agua y jabón la región perivulvar (80).

Una vez que el embrión fue descongelado y evaluado se aspiró con medio de transferencia de embriones en una pajilla de 0.25 ml, la cual se colocó en una pistola para transferencia de embriones con funda de plástico y punta metálica con dos salidas laterales, y sobre ésta una camisa sanitaria de plástico (80) (Figura 5).

Unicamente en el caso de los 25 embriones del grupo experimental (etilén glicol) que se transfirieron directamente a vacas receptoras, no se realizó su evaluación post-descongelación.

Posteriormente se realizó la transferencia no quirúrgica, procediendo a abrir los labios vulvares para evitar que la pistola se contaminara al entrar a la vagina.

Una vez en el cérvix se rompió la camisa sanitaria para que sólo la pistola pasara el cérvix, evitando con esto cualquier tipo de contaminación que se hubiera arrastrado de la vagina.

Una vez atravesado el cérvix, se dirigió la pistola hacia el cuerno uterino en cuyo lado previamente se detectó el cuerpo lúteo (76,77,81,97) y se guió suavemente hasta el tercio anterior del mismo, teniendo cuidado de no lesionar el endometrio. Cuando la punta del aplicador se colocó en el sitio indicado, se empujó el émbolo de la pistola para depositar el embrión (80) (FIGURA 6).

El diagnóstico de gestación se realizó el día 21 post-transferencia únicamente en las vacas que no repitieron estro, por medio de radioinmunoanálisis (RIA) de progesterona en sangre (81,142). Se consideró una hembra como gestante cuando las concentraciones de progesterona fueron mayores o iguales a 1 ng/ml y no gestante con concentraciones menores a 1 ng/ml. El diagnóstico se confirmó el día 65 de gestación por medio de ultrasonido de tiempo real (142), observando la presencia de placentomas o del producto.

JV.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comparó el porcentaje de embriones desarrollados *in vitro* después de la descongelación de cada uno de los grupos, utilizando una prueba de homogeneidad (ji-cuadrada). De la misma manera se comparó el porcentaje de fertilidad entre los dos grupos (94).

Para calcular el porcentaje de embriones desarrollados *in vitro* post-descongelación, se consideró el número de los embriones que se encontraban en estadio de mórula y lograron pasar a blastocisto y los que se encontraban en estadio de blastocisto que lograron eclosionar.

Para calcular el porcentaje de fertilidad, se consideró el número de becerros nacidos para cada uno de los crioprotectores.

V.- RESULTADOS

Utilizando las técnicas combinadas de aspiración y disección de ovocitos, en doce colectas se logró obtener un total de 1597 ovocitos a partir de 214 ovarios, lo cual representó un promedio de 7.5 ovocitos de calidad 1 y 2 por ovario (Cuadro 1).

De los 1597 ovocitos obtenidos se logró la maduración *in vitro* de 1331 (83.34%), resultando fertilizados *in vitro* 575 ovocitos (43.20%). De éstos 575 se desarrollaron *in vitro* 65 mórulas (11.3%) y 24 blastocistos (4.18%), para una eficiencia final de 15.48% (Cuadros 2,3,4).

Los 89 embriones logrados (65 mórulas y 24 blastocistos), fueron congelados en 2 grupos: En el grupo A: 64 embriones (45 mórulas y 19 blastocistos) se congelarán con etilén glicol al 1.5 M; mientras que en el grupo B: 25 embriones (20 mórulas y 5 blastocistos) se congelarán con glicerol al 1.4 M (10%). (Cuadro 5).

5.1 GRUPO 1: Embriones descongelados y transferidos

Un total de 36 embriones, 25 del Grupo A (19 mórulas y 6 blastocistos) y 11 del Grupo B (7 mórulas y 4 blastocistos), se transfirieron por la técnica no quirúrgica a 36 vacas receptoras.

De las 36 vacas que fueron transferidas, únicamente 3 de ellas no repitieron calor a los 21 días post-transferencia, por lo que se les tomó una muestra sanguínea para medir los niveles de progesterona plasmática (RIA). Las 3 vacas muestreadas tuvieron niveles superiores a 1 ng/ml por lo que se consideraron como gestantes.

Para confirmar el diagnóstico de gestación de los 3 animales se procedió a realizar el ultrasonido, observandose solamente en dos de ellas los placentomas y el producto.

Del total de embriones transferidos del Grupo A, se obtuvieron 2 nacimientos (8%); mientras que de los embriones del Grupo B, no se obtuvo ninguno (0%) (Cuadro 6).

5.2 GRUPO 2: Embriones descongelados y desarrollados *in vitro*

De los 53 embriones restantes, 39 del Grupo A (26 mórulas y 13 blastocistos) y 14 del Grupo B (13 mórulas y 1 blastocisto), se sometieron a desarrollo *in vitro*. Del total de embriones del Grupo A expuestos a desarrollo *in vitro*, se obtuvo desarrollo en 27 de ellos (69.23%); mientras que de los embriones del Grupo B, sólo desarrollaron 5 (35.71%) (Cuadro 7).

CUADRO 1: Número total y promedio de ovocitos colectados.

OVOCITOS COLECTADOS		
COLECTA	OVARIOS	OVOCITOS
1	25	157
2	20	150
3	16	98
4	26	190
5	14	126
6	20	276
7	6	48
8	4	78
9	20	100
10	34	185
11	20	128
12	9	61
TOTAL	214	1597
PROMEDIO OBTENIDO		7.5

CUADRO 2: Número total y porcentaje de ovocitos madurados *in vitro*.

COLECTA NUMERO	NUMERO DE OVOCITOS	EXPANDIDOS	
		NUMERO	%
1	157	135	86
2	150	111	74
3	98	88	90
4	190	162	85
5	126	116	92
6	276	225	82
7	48	34	71
8	78	62	79
9	100	76	76
10	185	154	83
11	128	122	95
12	61	46	75
TOTAL	1597	1331	83.34

CUADRO 3: Número total y porcentaje de ovocitos fertilizados *in vitro*.

COLECTA NUMERO	NUMERO DE OVOCITOS EXPANDIDOS	FERTILIZADOS	
		NUMERO	%
1	135	76	56
2	111	24	22
3	88	28	32
4	162	77	48
5	116	71	61
6	225	98	44
7	34	21	62
8	62	27	44
9	76	21	28
10	154	55	36
11	122	54	44
12	46	23	50
TOTAL	1331	575	43.2

CUADRO 4: Número total y porcentaje de embriones desarrollados *in vitro*, según la etapa de desarrollo alcanzada.

COLECTA NUMERO	NUMERO DE OVOCITOS FERTILIZADOS	DESARROLLADOS					
		TOTALES	%	MORULAS	%	BLASTOS.	%
1	76	2	3	0	0	2	3
2	24	1	4	0	0	1	4
3	28	2	7	0	0	2	7
4	77	10	13	7	9	3	4
5	71	5	7	3	4	2	3
6	98	16	16	16	16	0	0
7	21	7	33	4	19	3	14
8	27	10	37	8	30	2	7
9	21	4	19	0	0	4	19
10	55	13	24	11	20	2	4
11	54	9	17	6	11	3	6
12	23	10	43	10	43	0	0
TOTAL	575	89	15.48	65	11.3	24	4.18

CUADRO 5: Número de embriones congelados, según la etapa de desarrollo alcanzada y crioprotector utilizado.

COLECTA NUMERO	DESARROLLADOS		CONGELADOS			
	MORULAS	BLASTOS.	ETILEN GLICOL		GLICEROL	
	MORULAS	BLASTOS.	MORULAS	BLASTOS.	MORULAS	BLASTOS.
1	0	2	0	2	0	0
2	0	1	0	0	0	1
3	0	2	0	2	0	0
4	7	3	0	0	7	3
5	3	2	3	2	0	0
6	16	0	16	0	0	0
7	4	3	4	3	0	0
8	8	2	8	2	0	0
9	0	4	0	4	0	0
10	11	2	11	2	0	0
11	6	3	3	2	3	1
12	10	0	0	0	10	0
TOTAL	65	24	45	19	20	5

CUADRO 6: Nacimientos logrados de los embriones transferidos, según la etapa de desarrollo alcanzada y crioprotector utilizado.

TRANSFERENCIA DE EMBRIONES							
ETILEN GLICOL				GLICEROL			
TRANSFERIDOS		NACIMIENTOS LOGRADOS		TRANSFERIDOS		NACIMIENTOS LOGRADOS	
MORULAS	BLASTOS.	MORULAS	BLASTOS.	MORULAS	BLASTOS.	MORULAS	BLASTOS.
19	6	2	0	7	4	0	0

% DE NACIMIENTOS	
2/25	8.00 a

% DE NACIMIENTOS	
0/11	0.00 a

a.- Valores de columna con la misma literal no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

CUADRO 7: Total y porcentaje de embriones desarrollados *in vitro* post-descongelación, según la etapa de desarrollo alcanzada y crioprotector utilizado.

DESARROLLO <i>IN VITRO</i> POST-DESCONGELACION							
ETILEN GLICOL				GLICEROL			
		DESARROLLADOS				DESARROLLADOS	
MORULAS	BLASTOS.	MORULAS	BLASTOS.	MORULAS	BLASTOS.	MORULAS	BLASTOS.
26	13	20	7	13	1	5	0

% DESARROLLO	
27/39	69.23 a

% DESARROLLO	
5/14	35.71 a

a.- Valores de columna con la misma literal no son diferentes estadísticamente ($P > 0.05$).

VJ.- DISCUSION

6.1 TRANSPORTE DE OVOCITOS

Está informado en la literatura que al disminuir la temperatura por debajo de 35°C puede resultar en perjuicio del desarrollo de los ovocitos recolectados (100), sin embargo también se ha probado que al almacenar los ovocitos por un período de 24 horas a menos de 25°C, estos no pierden su potencial para desarrollarse en embriones (108,144).

En este trabajo los ovarios se transportaron desde el rastro hasta el laboratorio de fertilización *in vitro* a una temperatura ambiente de 25-30°C. Esta forma de manejo es más práctica, ya que tratar de mantener la temperatura estable durante su transporte resulta complicado.

6.2 OBTENCION Y CLASIFICACION DE LOS OVOCITOS

Existen diferentes procedimientos para obtener los ovocitos de los ovarios en el laboratorio. Algunos autores sólo utilizan la aspiración o la disección de los ovarios, ya que con esto han obtenido buenos resultados, logrando por aspiración un promedio de 8 a 15 ovocitos por ovario y por disección de 18 a 22 ovocitos (75,107,129). Sin embargo, estos autores no mencionan si los ovocitos colectados son de la calidad requerida para ser sometidos a la maduración *in vitro*.

En éste estudio se utilizó la técnica de aspiración combinada con la disección del ovario, la cual se recomienda para obtener el mayor número de ovocitos posible por ovario.

Con la combinación de ambas técnicas, en este trabajo se obtuvo un promedio de 7.5 ovocitos de calidad 1 y 2 por ovario, lo cual resulta por debajo del promedio obtenido por otros autores el cual es de 11 a 29 ovocitos utilizando la misma combinación de técnicas (107,136).

Esta diferencia en el número de ovocitos obtenidos se puede atribuir a que no siempre el material biológico recogido en los rastros de la periferia de la ciudad es el más adecuado, ya que la mayoría proviene de animales de desecho por lo que se desconocen los antecedentes reproductivos, la raza (en algunos casos son animales cruzados), edad precisa, enfermedades padecidas y condiciones en las cuales fueron mantenidos en la explotación durante su vida productiva.

Por lo anterior, se recomienda para trabajos posteriores hacer una selección y clasificación del material biológico que se requiera utilizar, con la finalidad de evitar en lo posible un número elevado de variables que puedan afectar el trabajo de investigación.

Otro factor que también pudo influir en los resultados obtenidos es la poca experiencia del personal involucrado en éste trabajo en el desarrollo de ésta técnica, cuando se compara con investigadores de países desarrollados.

La utilización del microscopio para la clasificación de los ovocitos, es una técnica no invasiva la cual se puede realizar fácilmente sin alterar la estructura de los ovocitos. Además de que no se afectan los medios de cultivo que van a ser utilizados para su maduración y fertilización (44). Se ha informado que sólo los ovocitos de buena calidad (grado 1 y 2) maduran y desarrollan mejor que los de calidad deficiente (grado 3 y 4) (25).

6.3 MADURACION *IN VITRO* DE OVOCITOS

Diversos trabajos han tratado de investigar el efecto que ejercen las hormonas, sueros, factores de crecimiento y células somáticas utilizadas como co-cultivo en el medio de maduración, para lograr que un mayor número de ovocitos madurados *in vitro* se desarrollen hasta la etapa de mórula o blastocisto (37,44,85).

Algunos autores han demostrado que el utilizar células de la granulosa favorece la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos bovinos, además de que el utilizar éstas células aumentan el porcentaje de fertilización y el desarrollo embrionario (37,40,68). Además Mochizuki (85), obtuvo una mayor cantidad de blastocistos en el medio en que utilizó éstas células.

Existe evidencia en la literatura de que la presencia de FSH y LH en los medios de cultivo tienen un efecto benéfico en la maduración de los ovocitos (147).

En este trabajo el número de ovocitos expandidos que fueron madurados *in vitro* fue de 1597, lo que representa un 83%. Esto indica que el proceso está dentro de los límites normales reportados en la literatura, ya que los porcentajes van de 72 a 90% (13,24,126).

Por lo anterior se puede sugerir que el elevado porcentaje obtenido en este trabajo en cuanto a la maduración *in vitro* de los ovocitos, pudieran deberse en parte a que el medio de maduración utilizado contenía ambas hormonas, además de las células de la granulosa.

6.4 FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS

El porcentaje de embriones fertilizados *in vitro* obtenidos en este trabajo fue de 43%, lo que indica que los resultados obtenidos están acorde con lo encontrado en la literatura, que va de 44 a 63% (13,24,126).

El porcentaje de fertilización *in vitro* que se obtuvo en este trabajo muestra que aproximadamente el 50% de los ovocitos que expandieron no fertilizaron. Esto pudo deberse a que la evaluación de la maduración se basó en la expansión de las células del cumulus del ovocito y ésta no se encuentra correlacionada con la maduración de los mismos, tal como se afirma en la literatura (39,43,51).

Otra posible causa de este bajo porcentaje de fertilización es que se utilizó semen congelado, el cual no cuenta con las pruebas necesarias para su uso específico en este tipo de técnica, ya que el semen utilizado en este trabajo proviene de toros cuya única prueba de fertilidad son sus antecedentes en programas de inseminación artificial. Sin embargo, algunos de estos toros podrían ser evaluados en cuanto a su capacidad de fertilización *in vitro* para trabajos posteriores, ya que se sabe que cada toro posee una influencia diferente y significativa sobre el porcentaje de fertilización y el desarrollo embrionario (56,128). También pudo influir en estos resultados la raza del toro y la concentración espermática utilizada, sin embargo éstos factores no se evaluaron en éste trabajo.

Otros factores que pudieron influir en estos resultados son: El tiempo de colección de los ovocitos (desde el sacrificio hasta su colección), la calidad de los ovocitos o el medio de maduración, el cual fue suplementado con FSH y LH.

Se ha encontrado que los medios suplementados con este tipo de hormonas provocan una marcada expansión celular (93), lo cual no necesariamente indica que los ovocitos hayan alcanzado una maduración completa o que estén listos para ser fertilizados. También pudo influir la experiencia del personal del laboratorio en el desarrollo de ésta técnica, cuando se compara con investigadores de países altamente desarrollados que han trabajado durante años en ésta técnica.

6.5 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES

El co-cultivo de embriones con células somáticas en medios de cultivo ha sido un eficiente método para ayudar al desarrollo de los embriones bovinos después de su maduración y fertilización *in vitro*.

El porcentaje total de desarrollo obtenido en este trabajo fue de 15% (11% mórulas y 4% Blastocistos), por lo que estos resultados se encuentran por debajo del 24 a 31% obtenido por otros autores que han utilizado el mismo medio de maduración y condiciones de desarrollo similares a los utilizados en este trabajo (13,24). Sin embargo, existen trabajos en donde el porcentaje obtenido ha sido de 13% (47,128), el cual se encuentra por debajo del porcentaje logrado en éste trabajo. Además Van Soom (129), únicamente obtuvo un 5% de desarrollo.

Una posible causa del bajo porcentaje de desarrollo embrionario obtenido, es que la mayoría de los ovarios utilizados en este experimento provenían de vacas de raza Holstein, las cuales en su mayoría presentaban condiciones corporales malas, lo cual se pudo haber reflejado en la calidad de los ovocitos. En otros países se utilizan y sacrifican animales en mejores condiciones de salud, por ejemplo, en algunos casos se utilizan vacas jóvenes y vaquillas de razas cárnicas producidas expresamente para el abasto.

Otra causa puede ser la posibilidad de haber incluido en forma involuntaria algunos ovocitos no fertilizados en el medio de desarrollo, al colocar las células de la granulosa para el co-cultivo (39).

Los porcentajes de partenogénesis reportados en la literatura van desde 0 hasta 6% (39,60,71), y dado que este porcentaje es relativamente bajo, en este trabajo no se evaluó esta anomalía, ya que es sabido que los ovocitos partenogénéticos no logran alcanzar los estadios de mórula o blastocisto, que son los únicos importantes para la congelación (39,146).

6.6 CONGELACION Y DESCONGELACION DE LOS EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO*

Las diferencias que existen en la permeabilidad que presentan los embriones a los crioprotectores y al agua, tiene mucho que ver en la manera en que se rehidrata al embrión y se remueve el crioprotector utilizado después de su descongelación.

La dilución de los crioprotectores en varios pasos se utiliza comúnmente (41,81,131), aunque el tiempo empleado para que el crioprotector salga del embrión en cada paso de esta dilución es considerablemente mayor que en la rehidratación directa.

La sacarosa que se utiliza durante la rehidratación del embrión tiene la finalidad de mantener el equilibrio osmótico entre el embrión y el medio ambiente en el cual se encuentra, mientras la concentración externa del crioprotector disminuye (131). En este experimento los embriones congelados en etilén glicol toleraron la rehidratación directa en el medio de transferencia sin la necesidad de utilizar una serie de pasos o una solución con sacarosa para la dilución del crioprotector.

En este trabajo se observó que tanto el glicerol como el etilén glicol son agentes crioprotectores efectivos para congelar embriones bovinos producidos *in vitro*, ya que los embriones que se congelaron en glicerol al igual que los del etilén glicol, sobrevivieron a su desarrollo *in vitro* post-descongelación.

A pesar de no existir diferencia estadísticamente significativa en los resultados de este trabajo, se pudo observar que el número de embriones desarrollados *in vitro* post-descongelación fue mayor con etilén glicol que con glicerol (69% y 36% respectivamente).

Esto concuerda con los hallazgos de otros autores, en donde observaron que el etilén glicol es superior que el glicerol en cuanto a la protección de los embriones (131). Por lo anterior se puede sugerir que el etilén glicol puede ser un agente crioprotector efectivo para la congelación de embriones bovinos producidos *in vitro*.

Las diferencias observadas en la viabilidad de los embriones congelados en etilén glicol o en glicerol pueden deberse a las propiedades físicas que tiene cada uno de los agentes crioprotectores utilizados. Las diferencias en la permeabilidad de los crioprotectores hacia los embriones no se evaluaron en este trabajo.

Szell (120) encontró que los embriones bovinos son más permeables al etilén glicol que al glicerol. En éste experimento los porcentajes de desarrollo de los embriones congelados con etilén glicol y rehidratados directamente en el medio de transferencia son comparables con los obtenidos con los embriones congelados en glicerol y rehidratados en tres pasos. Esto concuerda con trabajos previos en donde se observa que el etilén glicol puede ser removido del embrión directamente sin causar daños celulares importantes (131).

Los porcentajes de nacimientos, tanto a partir de embriones congelados con glicerol (0%), como con etilén glicol (8%), son inferiores a los descritos en la literatura por otros investigadores, los cuales son de 29% para etilén glicol y de 20 a 42% para glicerol (48,113). Sin embargo, estos resultados se podrán mejorar a medida que se vaya adquiriendo una mayor experiencia en los procedimientos descritos anteriormente (maduración, fertilización y cultivo *in vitro*).

Otro factor que pudo influir significativamente en los bajos porcentajes de nacimientos obtenidos con los embriones congelados en etilén glicol, es que se transfirieron a las vacas receptoras directamente en condiciones de campo, por lo que no se evaluaron previamente a su transferencia para conocer si el estadio de desarrollo y calidad post-descongelación era el adecuado.

Esto sugiere que la posible influencia de embriones con degeneración celular, conjuntamente con el estrés que se produce durante la descongelación, haya provocado la muerte del embrión. Sin embargo, cabe señalar que existen otros factores que de no tomarse en cuenta pueden contribuir a la pérdida de los embriones después de la transferencia, como son: El sitio de colocación del embrión en el útero, el método de transferencia, la nutrición de la receptora, la sincronía receptora/embrión, así como los tratamientos farmacológicos y hormonales de la vaca receptora, por citar algunos. Además se sabe que los embriones producidos *in vitro* son más sensibles que los obtenidos *in vivo* (70).

El porcentaje de nacimientos obtenido con etilén glicol, a pesar de no existir diferencia estadísticamente significativa es superior al del glicerol, lo cual concuerda con otros trabajos en donde la utilización del etilén glicol como agente crioprotector es mejor que el glicerol en los porcentajes de gestación de embriones producidos *in vitro* (131).

Greve (45) informó que basandose en la literatura disponible es imposible comparar el porcentaje de preñez y de supervivencia embrionaria post-transferencia debido a que existen diferentes métodos de congelación y criterios variables en la selección de embriones, sin embargo generalmente se acepta que los embriones producidos *in vitro*, congelados y descongelados producen un bajo porcentaje de preñez al día 42.

A nivel de campo la descongelación de embriones por el método de un solo paso reduce la necesidad de utilizar equipos complejos, disminuyendo los costos en la utilización de ésta técnica, por lo que ésto favorece la idea expuesta por algunos autores de lograr una utilización masiva de la transferencia de embriones al hacer que en el futuro, técnicos en inseminación artificial con cierto grado de capacitación puedan realizar la transferencia directa de los embriones (90).

Por otra parte, algunos autores han observado casos de becerros nacidos con anomalías congénitas a partir de embriones congelados producidos *in vitro* (42,109,128), así como de becerros con un elevado peso al nacimiento (7,132).

En este trabajo se obtuvieron dos crías, las cuales nacieron con peso ligeramente superior al normal (40 Kg) y sin ninguna anomalía congénita, además de que hasta el año de edad su desarrollo ha sido normal.

VII.- CONCLUSIONES

La combinación de las técnicas de aspiración y disección de los ovarios, permitió obtener un promedio de 7.5 ovocitos de calidad 1 y 2 para ser empleados en la producción *in vitro* de embriones bovinos.

Los resultados obtenidos indican que las condiciones de maduración, fertilización y desarrollo *in vitro* utilizadas en éste trabajo son las adecuadas, ya que permiten que los ovocitos se desarrollen hasta la etapa de embrión.

El etilén glicol resulto ser un crioprotector efectivo para la congelación de embriones bovinos producidos *in vitro*, además de que al utilizar este crioprotector se reduce el tiempo en la preparación del embrión y su transferencia a un vientre receptor.

Se requiere realizar un mayor número de estudios en el futuro para evaluar más ampliamente estos y otros agentes crioprotectores y poder determinar cuál es el mejor.

En México, este es el primer reporte del nacimiento de becerros, a partir de embriones bovinos congelados y descongelados producidos totalmente *in vitro*.

VVVJ- LITERATURA CITADA

- 1.- Aurich C, Hahn J. In vitro maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes in a modified Ménézo B2 medium. Anim. Reprod. Sci. 1994;35:153-162.
- 2.- Ball GD, Leibfried ML, AX RL, First NL. Symposium: Embryo development and manipulation. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. J. Dairy Sci. 1984;67:2775-2785.
- 3.- Barnes F, Endebrock M, Looney C, Powell R, Westhusin M, Bondioli K. Embryo cloning in cattle: the use of in vitro matured oocytes. J. Reprod. Fert. 1993;97:317-320.
- 4.- Bavister BD, Chen AF, Fu PC. Catecholamine requirement for hamster sperm motility in vitro. J. Reprod. Fert. 1979;56:507-513.
- 5.- Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol. Reprod. 1983;28:235-247.
- 6.- Bavister BD, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 1977;16:228-237.
- 7.- Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreuzer BR, Medrano JF, Murray JD. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology 1995;44:227-232.
- 8.- Bracke C, Niemann H. New aspects in the freezing of embryos from livestock. 11e. Réunion A.E.T.E. Hannover. 8-9 September 1995. Pp. 101-111.
- 9.- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Reprod. 1982;27:147-158.
- 10.- Brackett BG, Keefer CL, Troop CG, Donawick WJ, Bennett KA. Bovine twins resulting from in vitro fertilization. Theriogenology 1984;21:224.
- 11.- Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 1993;39:43-64.
- 12.- Brinster RL. In vitro culture of mammalian embryos. J. Anim. Sci. 1968;27:1-14.
- 13.- Byrd SR, Flores-Foxworth G, Applewhite AA, Westhusin ME. In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. Theriogenology 1997;47:857-864.

- 14.- Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* 1994;41:1061-1068.
- 15.- Carolan C, Monaghan P, Mehmood A, Lonergan P, Gallagher M, Gordon I. Slicing of bovine ovaries as a means of oocyte recovery. *J. Reprod. Fert.* 1992;9:51.
- 16.- Carvalho RV, Del Campo MR, Plante Y, Mapletoft RJ. Effects of stage of development on sex ratio and survival after freezing of day 7 bovine ivf embryos. *Theriogenology* 1995;43:183.
- 17.- Coulthard H. Embryo transfer. *Vet. Rec.* 1992;130:116.
- 18.- Cseh S, Corselli J, Nehlsen-Cannarella SL, Bailey LL, Szalay AA. The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology* 1997;48:43-50.
- 19.- Cseh S, Kreysing U, Lucas-Hahn A, Niemann H. Direct rehydration of ivm, ivf and ivc bovine embryos frozen in ethylene-glycol. *Theriogenology* 1995;43:190.
- 20.- Chang MC. In vitro fertilization of mammalian eggs. *J. Anim. Sci.* 1968;27:15-22.
- 21.- Chian RC, Niwa K. Effect of cumulus cells present during different periods of culture on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology* 1994;41:176.
- 22.- Chian RC, Okuda K, Niwa K. Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 1995;38:37-48.
- 23.- Chikamatsu N, Urakawa M, Fukui Y, Aoyagi Y, Ono H. In vitro fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured in different cultured systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. *Japan J. Anim. Reprod.* 1989;35:154-158.
- 24.- De Armas R, Solano R, Castro FO, Pupo CA, Aguilar A, Riego E. Producción de embriones bovinos por fecundación in vitro. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 1992;23:109-112.
- 25.- De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip AM. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 1989;24:197-204.
- 26.- Del Campo MR, Donoso MX, Palasz AT, Garcia A, Mapletoft RJ. The effect of days in co-culture on survival of deep frozen bovine ivf blastocysts. *Theriogenology* 1993;39:208.
- 27.- Dinnyés A, Carolan C, Lonergan P, Solti L, Massip A, Mermillod P. In vitro survival of in vitro produced (ivp) bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology* 1995;43:197.

- 28.- Dochi O, Imai K, Takakura H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Anim. Reprod. Sci.* 1995;38:179-185.
- 29.- Dorn CG, Kraemer DC. Bovine Embryo Grading. Texas A&M University, College of Veterinary Medicine, Texas Veterinary Medical Center. 1987. pp. 1-17.
- 30.- Dresser BL, Gelwicks EJ, Wachs KB, Keller GL. Embryo cryopreservation and transfer in the domestic cat (*Felis catus*). 11th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, jun. 26-30, vol. 2 (Brief Communications), Dublin, Ireland, 1988:160.
- 31.- Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965;196:349-351.
- 32.- Elmileik AMA, Maeda T, Terada T. Higher rates of development into blastocyst following the in vitro fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplemented with the fluid from large bovine follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 1995;38:85-96.
- 33.- Eyestone WH, Vignieri J, First NL. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology* 1987;27:228.
- 34.- Farin CE, Farin PW, Yang L, Martus NS, Collins EB. Survival of in vitro and in vivo produced bovine embryos after transfer. *Biol. Reprod.* 1992;46:121.
- 35.- Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology* 1992;29:485-492.
- 36.- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and culture with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 1990;42:114-119.
- 37.- Fukui Y, Ono H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1989;86:501-506.
- 38.- Fukui Y, Sakuma Y. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 1980;22:669-673.
- 39.- Fukui Y, Urakawa M, Sasaki C, Chikamatsu N, Ono H. Development to the late morula or blastocyst stage following in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 1989;18:139-148.
- 40.- Fukui Y. Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1990;26:40-46.

- 41.- Furnus CC, De Matos DG, Martínez AG, Matkovic M. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of in-vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 1997;47:481-490.
- 42.- Galli C, Lazzari G. Practical aspects of ivm/ivf in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42:371-379.
- 43.- Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 1990;33:77-87.
- 44.- Gordon I. Laboratory production of cattle embryos CAB International. University Press. Cambridge, 1994.
- 45.- Greve T, Avery B, Callesen H. Viability of in vivo and in vitro produced bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 1993;28:164-169.
- 46.- Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6a. Edición ED. Interamericana-McGraw-Hill. 1996.
- 47.- Han YM, Yamashina H, Koyama N, Lee KK, Fukui Y. Effects of quality and developmental stage on the survival of ivf-derived bovine blastocysts cultured in vitro after freezing and thawing. *Theriogenology* 1994;42:645-654.
- 48.- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine ivf embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995;43:141-152.
- 49.- Hasler JF, Hurtgen PJ, Stokes JE, Jin ZQ. Influence of time of exposure to glycerol or ethylene glycol on the survival of frozen-thawed bovine ivf embryos. *Theriogenology* 1996;45:172.
- 50.- Hasler JF, Stokes JE, Merton JS. Comparison of two different populations of BRL cells in a bovine in vitro culture system. *Theriogenology* 1994;41:214.
- 51.- Hawk HW, Nel ND, Waterman RA, Wall RJ. Investigation of means to improve rates of fertilization in vitro matured/in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 1992;38:989-998.
- 52.- Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from In Vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 1994;41:1571-1583.
- 53.- Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. II. Media and co-culture cells. *Theriogenology* 1994;41:1585-1594.
- 54.- Hazeleger NI, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 1995;43:509-522.

- 55.- Hensleigh HC, Hunter AG. In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent in vitro fertilization and cleavage. J. Dairy Sci. 1983;68:1456-1462.
- 56.- Hillery FL, Parrish JJ, First NL. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. Theriogenology 1990;33:249.
- 57.- Hochi S, Fujimoto T, Braun J, Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. Theriogenology 1994;42:483-488.
- 58.- Hochi S, Maruyama K, Oguri N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. Theriogenology 1996;46:1217-1224.
- 59.- Hyttel P, Greve T, Callesen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. J. Reprod. Fert. 1989;38:35-47.
- 60.- Iritani A, Niwa K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 1977;50:119-121.
- 61.- Jackowsky S, Leibo SP, Mazur P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. J. Exp. Zool. 1980;211:329-341.
- 62.- Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. Anim. Reprod. Sci. 1996;42:67-75.
- 63.- Kashiwazaki N, Ohtani S, Nagashima H, Yamakawa H, Cheng WTK, Lin A-C, Ma RC-S, Ogawa S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. Theriogenology 1991;35:221.
- 64.- Katska L. Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. Anim. Reprod. Sci. 1984;7:461-463.
- 65.- Keefer CL, Paprocki AM. Effect of percoll following sperm separation on in vitro fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 1995;43:244.
- 66.- Keefer CL. New techniques for assisted fertilization. Theriogenology 1990;33:101-111.
- 67.- Kinis A, Vergos E, Gordon I, Gordon A, Gallagher M. Studies in the production of chimaeric cattle embryos by aggregation of blastomeres from embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro. Theriogenology 1990;33:268.
- 68.- Kotsuji F, Kubo M, Tominaga T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 1994;100:151-156.
- 69.- Lee CN, AX RL. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract. J. Dairy Sci. 1984;67:2006-2009.

- 70.- Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993;39:81-94.
- 71.- Lengwinat T, Blottner S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 1994;35:291-301.
- 72.- Lim JM, Fukui Y, Ono H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 1992;37:351-361.
- 73.- Ling ZJ, Lu KH. Frequency of cleavage and development in vitro of bovine oocytes fertilized in different numbers in drops with different sperm concentrations. *Theriogenology* 1990;33:275.
- 74.- Lohuis MM. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 1995;43:51-60.
- 75.- Lonergan P, Vergos E, Kinis A, Sharif H, Gallagher M, Gordon I. The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for in vitro maturation. *Theriogenology* 1991;35:231.
- 76.- Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M, McGovern H. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. *Vet. Rec.* 1988;122:539-540.
- 77.- Lu KH, Gordon I, Gallagher M. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 1987;121:259-260.
- 78.- Lu KH, Shi DS, Jiang HS, Goulding D, Boland MP, Roche JF. Comparison of the developmental capacity of bovine oocytes from superovulated and non stimulated heifers. *Theriogenology* 1991;35:234.
- 79.- Macháty Z, Páldi A, Csáki T, Varga Z, Kiss I, Bárándi Z, Vajta G. Biopsy and sex determination by pcr of ivf bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 1993;98:467-470.
- 80.- Mapletoff RJ. Embryo transfer and genetic engineering. In: Morrow DA, editor. *Current therapy in theriogenology* II. II. Philadelphia: Saunders. 1986. pp. 51-60.
- 81.- Massip A, Mermillod P, Van Langendonck A, Reichenbach HD, Lonergan P, Berg U, Carolan C, De Roover R, Brem G. Calving outcome following transfer of embryos produced in vitro in different conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;44:1-10.
- 82.- McGinnis LK, Duplantis SC, Youngs CR. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Anim. Reprod. Sci.* 1993;30:273-280.

- 83.- Meizel S, Working PK. Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reactions by catecholamines in vitro. *Biol. Reprod.* 1980;22:211-216.
- 84.- Miller GF, Gliedt DW, Rakes JM, Rorie RW. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 1994;41:689-696.
- 85.- Mochizuki H, Fukui Y, Ono H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991;36:973-986.
- 86.- Mohr LR, Trounson AO. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.* 1981;25:1009-1025.
- 87.- Monaghan P, Carolan C, Lonergan P, Sharif H, Wahid H, Gordon I. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1993;39:270.
- 88.- Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J. Reprod. Fert.* 1977;49:101-109.
- 89.- Mylne J, McKelvey B, Broadbent P, MacMillan D. Salvage of bovine oocytes. *Vet. Rec.* 1992;130:59.
- 90.- Nibart M, Humblot P. Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology* 1997;47:371.
- 91.- Niemann H. Cryopreservation of bovine embryos in the field. *Embryo Transfer Newsletter* 1990;8:5-7.
- 92.- Nowshari MA, Holtz W. In vitro culture of goat morulae to blastocysts before freezing. *Theriogenology* 1995;44:983-988.
- 93.- Olson SE, Thomas WK, Seidel GE. Effects of gonadotropins during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryonic development. *Theriogenology* 1991;35:250.
- 94.- Ott L. An introduction to statistical methods and data analysis. 3rd ed. United States of America: PWS-Kent. 1988.
- 95.- Palasz AT, Gustafsson H, Rodríguez-Martínez H, Gusta L, Larsson B, Mapletoft RJ. Vitrification of bovine ivf blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology* 1997;47:865-879.

- 96.- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First WL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 1985;24:537-549.
- 97.- Pavasuthipaisit K, Tocharus C, Thonabulsombat C, Kitiyanant Y. The viability testing of frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 1993;39:280.
- 98.- Pérez PF. Reproducción animal: Inseminación artificial y trasplante de embriones. Ed. Científico-médica. Barcelona. 1985.
- 99.- Pollard JW, Leibo SP. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993;39:287.
- 100.- Pollard JW, Martino A, Rumph ND, Songsasen N, Plante C, Leibo SP. Effect of ambient temperatures during oocyte recovery on in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 1996;46:849-858.
- 101.- Prokofiev MI, Ernst LK, Suraeva MN, Lagutina IS, Udavlennikova NN, Kesyan AZ, Rabahi. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis of bovine follicular cells during the preovulatory period. *Molec. Reprod. Develop.* 1991;30:265-274.
- 102.- Rall WF, Meyer TK. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 1989;31:683-692.
- 103.- Reinders JMC, Wurth YA, Kruij AM. From embryo to calf after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 1995;43:306.
- 104.- Romo GS. Biotecnología reproductiva: Avances en ganado bovino. *Vet. Mex.* 1993;24:177-184.
- 105.- Rose TA, Bavister BD. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1992;31:72-77.
- 106.- Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L. Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete Res.* 1987;16:343-354.
- 107.- Sato E, Matsuo M, Miyamoto H. Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: Improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Anim. Sci.* 1990;68:1182-1187.
- 108.- Scherthaner W, Schmoll F, Brem G, Schellander K. Storing bovine ovaries for 24 hours between 15 and 21°C does not influence in vitro production of blastocysts. *Theriogenology* 1997;47:297.

- 109.- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J, Hansen HB. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* 1996;46:527-539.
- 110.- Schneider U, Mazur P. Implications and applications of the long-term preservation of embryos by freezing. In: Morrow DA, editor. *Current therapy in theriogenology II*. Philadelphia: Saunders, 1986. pp. 81-83.
- 111.- Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984;21:68-79.
- 112.- Seidel GE. Methods and comparative aspects of embryo cryopreservation in domestic animals. *Equine. Vet. J.* 1989;Supp. 8:77-79.
- 113.- Seregi J, Cseh S, Treuer A. The first successful transfer of frozen embryos derived from ivmfc of bovine oocytes in Hungary. *Theriogenology* 1995;43:321.
- 114.- Shi DS, Lu KH, Gordon I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology* 1990;33:324.
- 115.- Smorag Z, Gajda B, Wieczorek B, Jura J. Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* 1989;31:1227-1231.
- 116.- Solano R, De Armas R, Caral J, Holy L. Congelación de embriones bovinos. I. Efecto de la calidad y estadio de desarrollo durante la congelación y descongelación. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* 1988;19:183-192.
- 117.- Suh TK, Rehman N, Collins A, Wright RW. Effects of granulosa cells from different size follicles in co-culture with bovine oocytes on maturation, fertilization and cleavage. *Theriogenology* 1993;39:323.
- 118.- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H, Oe M. Pregnancy rate and survival in culture of in vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology* 1993;40:651-659.
- 119.- Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Nishikata Y, Okamoto K, Tsukahara T. Effect of media on fertilization and development rates of in vitro fertilized embryos, and of age and freezing of embryos on pregnancy rates. *Theriogenology* 1991;35:278.
- 120.- Szell A, Shelton JN, Szell K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 1989;26:297-301.
- 121.- Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Molec. Reprod. Develop.* 1993;34:266-271.

- 122.- Takagi M, Boediono A, Saha S, Suzuki T. Survival rate of frozen-thawed bovine ivf embryos in relation exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology* 1993;30:306-312.
- 123.- Takagi M, Otoi T, Boediono A, Saha S, Suzuki T. Viability of frozen-thawed bovine ivm/ivf embryos in relation to aging using various cryoprotectants. *Theriogenology* 1994;41:915-921.
- 124.- Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LEA, Newcomb R. The storage of cows eggs at room temperature and at low temperatures. *J. Reprod. Fert.* 1987;46:173-178.
- 125.- Tsuzuki Y, Go J, Fujihara N, Ashizawa K. Ultrastructural studies of bovine blastocysts fertilized in vitro associated with freezing and thawing. *Proceedings of the 20th International congress on animal reproduction (the Hague)* 1992;3:1487-1489.
- 126.- Utsumi K, Kato H, Iritani A. Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1991;35:695-703.
- 127.- Van Inzen WG, Kruip AM, Weima SM. Use of conditioned medium for ivm-ivf bovine embryos in-vitro culture system. *Theriogenology* 1993;39:236.
- 128.- Van Soom A, Mijten P, Van Vlaenderen I, Vanden Branden J, Mahmoudzadeh AR, De Kruif A. Birth of double-muscled Belgian Blue calves after transfer of in vitro produced embryos into dairy cattle. *Theriogenology* 1994;41:855-867.
- 129.- Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Ysebaert MT, De Kruif A. Salvage of oocytes from sterile genetically valuable cows, resulting in the birth of a calf. *Anim. Reprod. Sci.* 1994;36:187-196.
- 130.- Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1992;37:23-37.
- 131.- Voelkel SA, Hu YX. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 1992;37:687-697.
- 132.- Walker SK, Hartwich KM, Seamark R. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology* 1996;45:111-120.
- 133.- Wang WL, Jiang HS, Lu KH, Gordon I, Polge C. The effect of gas phase on the in vitro development of bovine embryos derived from in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes. *Theriogenology* 1992;37:320.
- 134.- Westhusin ME, De Azambuja RM. Development of in vitro derived bovine embryos following pronuclear transplantation and in vitro culture. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;45:29-35.

- 135.- Westhusin ME, Piedrahita JA. Application of animal biotechnology to the beef industry. Korean J. Emb. Trans. 1995;10:1-13.
- 136.- Whitesell TH, Hill KG, Miller DR, Jones AL, Wilson JM. In vitro embryo production from oocytes recovered from excised ovaries of terminally ill cows. Theriogenology 1992;37:322.
- 137.- Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature 1971;233:125-126.
- 138.- Whittingham DG. Survival of rat embryos after freezing and thawing. J. Reprod. Fert. 1975;43:575-578.
- 139.- Wilmut I, Rowson LEA. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec. 1973;92:686-690.
- 140.- Wolfe BA, Kraemer DC. Methods in bovine nuclear transfer. Theriogenology 1992;37:5-15.
- 141.- Xu KP, Greve T, Callesen H, Hyttel P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 1987;81:501-504.
- 142.- Xu KP, Yadav BR, Rorie RW, Plante L, Betteridge KJ, King WA. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. J. Reprod. Fert. 1992;94:33-43.
- 143.- Yang NS, Duff R, Lu KH, Gordon I, Polge C. Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos produced in vitro. Theriogenology 1991;35:297.
- 144.- Yang NS, Lu KH, Gordon I. In vitro fertilization (ivf) and culture (ivc) of bovine oocytes from stored ovaries. Theriogenology 1990;33:352.
- 145.- Yang YB, Lu KH. The influence of bovine oocyte type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro. Theriogenology 1990;33:355.
- 146.- Yang Z, Smith LC. Parthenogenetic development in-vitro of bovine secondary oocytes exposed to a single electric pulse. Theriogenology 1993;39:344.
- 147.- Zuelke KA, Brackett G. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. Biol. Reprod. 1990;43:784-787.

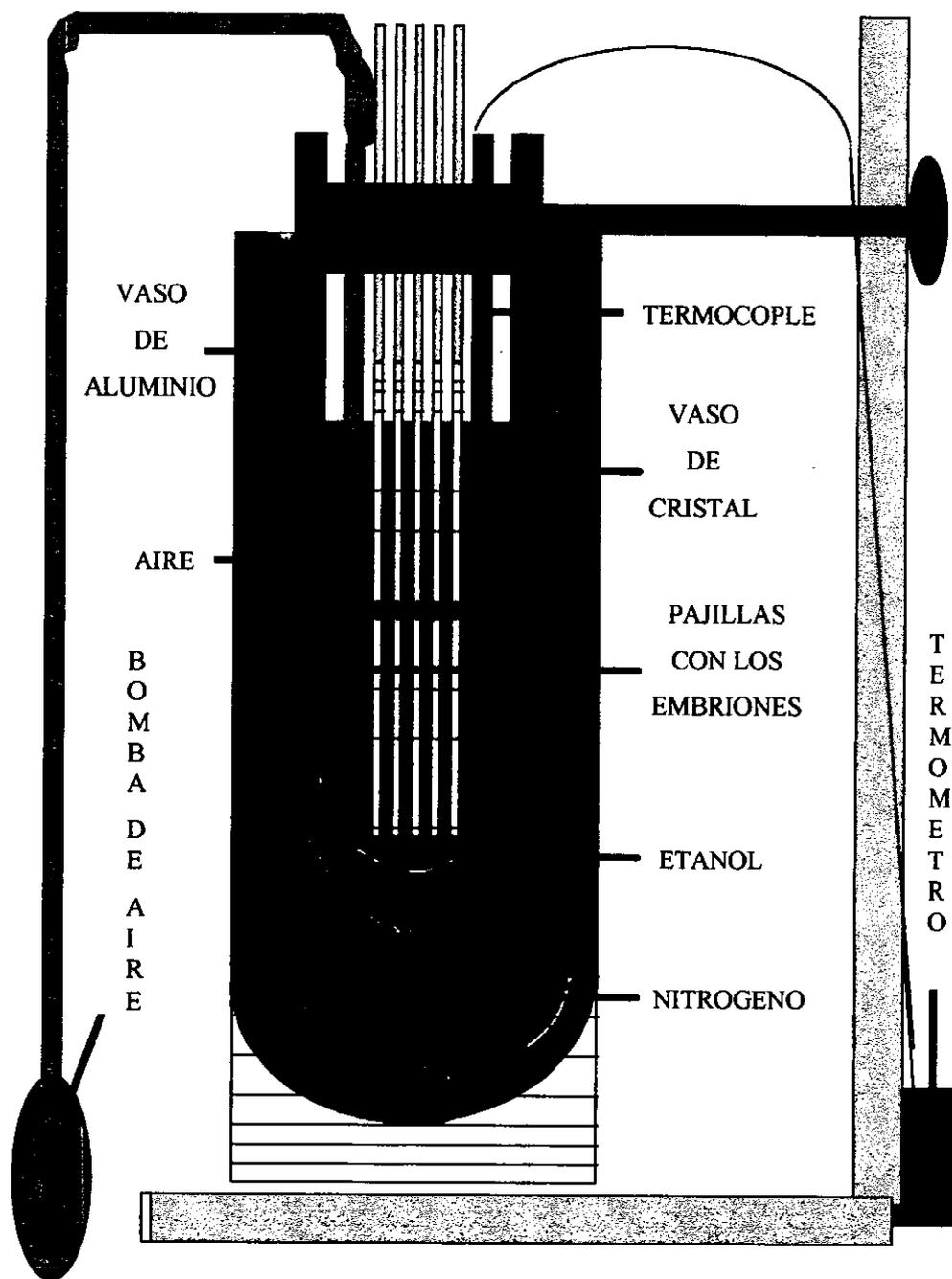
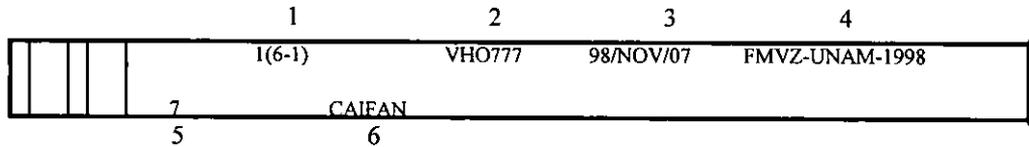


FIGURA 1: Congeladora manual y semiautomática (Diseñada por Robertson, E.).



DATOS PARA LA IDENTIFICACION DE LOS EMBRIONES (INSCRITOS EN LA PAJILLA)

- 1.- Número de Embriones (Estadio-Calidad)
- 2.- Datos de la Donadora (Color del arete, Raza, Número de Animal)
- 3.- Fecha de la Congelación (Año/Mes/Día)
- 4.- Registro Internacional del Centro de Transferencia
- 5.- Número de la Pajilla
- 6.- Nombre del Toro o su Número de Registro

CODIGO DE IDENTIFICACION PARA PAJILLAS DE EMBRIONES CONGELADOS			
ESTADIO	No.	CALIDAD	No.
OVULO	1	EXCELENTE	1
2-16 CELULAS	2	BUENO	2
MORULA TEMPRANA	3	REGULAR	3
MORULA COMPACTA	4	MUERTO O DEGENERADO	4
BLASTOCISTO TEMPRANO	5		
BLASTOCISTO MADURO	6		
BLASTOCISTO EXPANDIDO	7		
BLASTOCISTO ECLOSIONADO	8		

FIGURA 2: Identificación de las pajillas utilizadas para la congelación de embriones, según lo establecido por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).



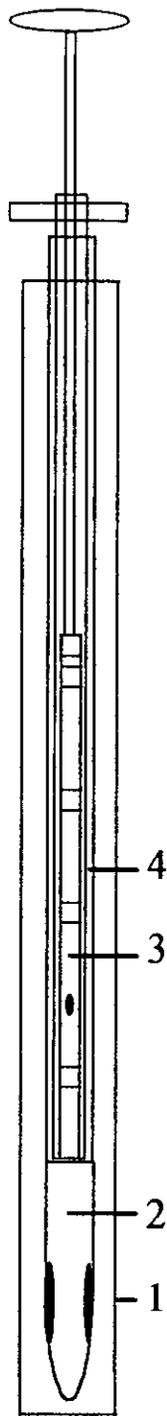
-  EMBRION
-  GLICEROL
-  AIRE
-  ALGODON
-  ALCOHOL POLIVINILICO

FIGURA 3: Empajillado de embriones en glicerol al 1.4 M (10%)



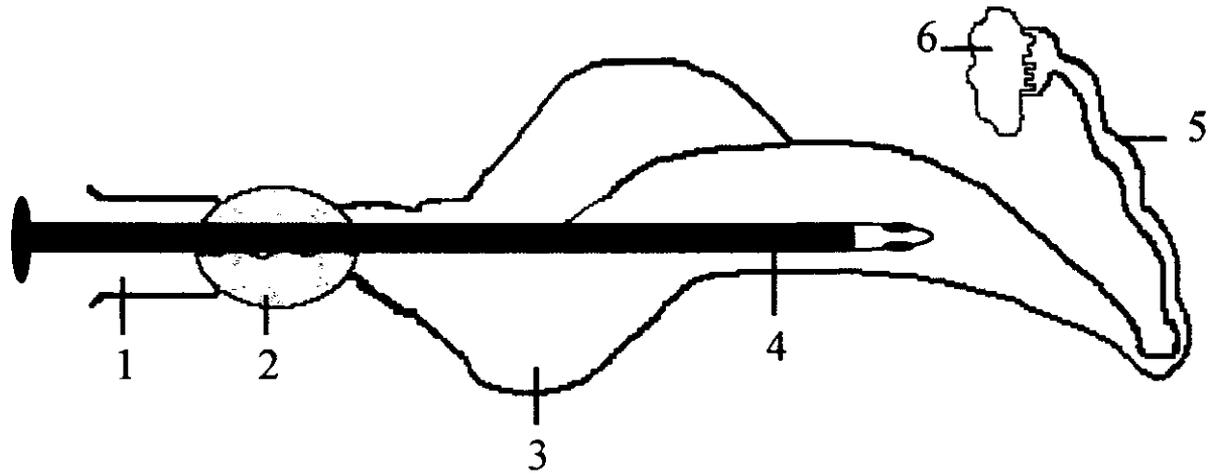
-  EMBRION
-  ETILEN GLICOL
-  MEDIO DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES
-  AIRE
-  ALGODON
-  ALCOHOL POLIVINILICO

FIGURA 4: Empajillado de embriones en etilén glicol al 1.5 M



- 1.- CAMISA SANITARIA
- 2.- FUNDA CON PUNTA METALICA Y DOBLE SALIDA
- 3.- PAJILLA CON EL EMBRION
- 4.- PISTOLA PARA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

FIGURA 5: Armado de la pistola para la transferencia de embriones



1.- VAGINA

2.- CERVIX

3.- UTERO

4.- PISTOLA PARA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

5.- OVIDUCTO

6.- OVARIO

FIGURA 6: Sitio de colocación del embrión en el útero, durante la transferencia de embriones por la técnica no quirúrgica

IX

ANEXO

PREPARACION DE
MEDIOS

9.1

SOLUCION SALINA 0.9%	
INGREDIENTES	
NaCl	900 mg
Agua	100 ml

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m
Almacenar a 5°C

9.2

PENICILINA—ESTREPTOMICINA	
INGREDIENTES	
Penicilina G Sódica	10000 Unidades
Sulfato de Estreptomicina	10000 μ g/ml
Agua Milli-Q	20 ml

Alicuotar en volumen de 100 μ l
Almacenar a -20°C

9.3

TL—HEPES		
INGREDIENTES	Mg/100 ml	mM
NaCl	666	114
KCl	24	3.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	30	2
MgCl ₂ 6H ₂ O	10	0.5
NaHCO ₃	16.8	2
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	4.7	0.34
Hepes	240	10
Lactato de Sodio	186 μ l	10
Rojo Fenol	1	1 μ l/ml
Piruvato de Sodio	5.5	0.5

Aforar a 100 ml con agua Milli-Q
Ajustar pH a 7.4
Ajustar osmolaridad (265-285 mOsm/Kg)
Agregar 300 mg/100 ml de BSA Fracción V
Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m
Almacenar a 4°C (Max. 15 días)

9.4

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

MEDIO DE MADURACION	
INGREDIENTES	
M-199 (Earle's)	4.4 ml
Suero Fetal Bovino	500 μ l
Hormona FSH	25 μ l
Hormona LH	25 μ l
Pen/Strep	50 μ l

Ajustar pH a 7.4

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

9.5

TRIPAN AZUL	
INGREDIENTES	
Tintura de Tripán Azul al 0.4%	3 ml
Solución Buferada (D-PBS)	5 ml

Almacenar a 5°C

9.6

MEDIO DE DESARROLLO	
INGREDIENTES	
M-199 (Earle's)	4.45 ml
Suero Fetal Bovino	500 μ l
Pen/Strep	50 μ l

Ajustar pH a 7.4

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

MEDIO DE FERTILIZACION	
INGREDIENTES	
Fert-TL-Stock	4.9 ml
Piruvato-Fert-Stock	50 μ l
Pen/Strep	50 μ l
BSA-FAF	30 mg

Ajustar pH a 7.4
Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

FERT-TL-STOCK		
INGREDIENTES	mg/100 ml	mM
NaCl	666	114
KCl	23.5	3.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	30	2
MgCl ₂ 6H ₂ O	10	0.5
NaHCO ₃	210.4	25
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	4.7	0.34
Lactato de Sodio	186 μ l	10
Rojo Fenol	1	1 μ l/ml

Aforar a 100 ml con agua Milli-Q
Ajustar Ph a 7.4
Ajustar osmolaridad (280-300 mOsm/Kg)
Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m
Almacenar a 4°C (Max. 15 días)

PIRUVATO-FERT-STOCK	
INGREDIENTES	
Piruvato de Sodio	22 mg
Solución Salina 0.9%	10 ml

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m
Alicuotar en volumen de 50 μ l
Almacenar a -20°C

PERCOLL 90%	
INGREDIENTES	
Percoll	45 ml
Sperm-TL-Modificado	5 ml
Lactato de Sodio	184 μ l
1 M de CaCl_2	99 μ l
0.1 M de MgCl_2	197 μ l
NaHCO_3	104.5 mg

Almacenar a 5°C

SPERM-TL-MODIFICADO	
INGREDIENTES	
1 M de KCl	3.09 ml
0.1 M de NaH_2PO_4	2.92 ml
NaCl	4.675 gm
Hepes	2.380 gm
Agua Milli-Q	100 ml

Ajustar pH a 7.3

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

Almacenar a 5°C

Reajustar pH según se ocupe

1 M DE KCl	
INGREDIENTES	
KCl	745 mg
Agua Milli-Q	10 ml

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

Almacenar a 5°C

0.1 M DE NaH_2PO_4	
INGREDIENTES	
NaH_2PO_4	13.8 mg
Agua Milli-Q	10 ml

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

9.10

SPERM-TL	
INGREDIENTES	
Sperm-TL-Stock	5 ml
Piruvato-Sperm-Stock	50 μ l
Pen/Strep	50 μ l
BSA-Fraccion V	30 mg

Ajustar pH a 7.4

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

SPERM-TL-STOCK		
INGREDIENTES	mg/100 ml	mM
NaCl	582	100
KCl	23	3.1
CaCl ₂ 2H ₂ O	29	2.1
MgCl ₂ 6H ₂ O	31	1.5
NaHCO ₃	209	25
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	4.1	0.29
Hepes	238	10
Lactato de Sodio	368 μ l	21.6
Rojo Fenol	1	1 μ l/ml

Aforar a 100 ml con agua Milli-Q

Ajustar pH a 7.4

Ajustar osmolaridad (290-310 mOsm/Kg)

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

Almacenar a 4°C (Max. 15 días)

PIRUVATO-SPERM-STOCK	
INGREDIENTES	
Piruvato de Sodio	110 mg
Solución Salina 0.9%	10 ml

Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

Alicuotar en volumen de 50 μ l

Almacenar a -20°C

PHE	
INGREDIENTES	
Penicilamina Stock	250 μ l
Hipotaurina Stock	250 μ l
Epinefrina Stock	100 μ l
Solución Salina 0.9%	400 μ l

PENICILAMINA-STOCK	
INGREDIENTES	
Penicilamina	3 mg
Solución Salina 0.9%	10 ml

Alicuotar en volumen de 250 μ l
Almacenar a -80°C

HIPOTAUURINA-STOCK	
INGREDIENTES	
Hipotaurina	1.09 mg
Solución Salina 0.9%	10 ml

Alicuotar en volumen de 250 μ l
Almacenar a -80°C

EPINEFRINA-STOCK	
INGREDIENTES	
Diluyente para Epinefrina	40 ml
Epinefrina	1.83 mg

Alicuotar en volumen de 100 μ l
Cubrir la alicuota con papel aluminio
Almacenar a -80°C

DILUYENTE PARA EPINEFRINA	
INGREDIENTES	
Lactato de Sodio	126 μ l
Metabisulfito de Sodio	50 mg
Agua	50 ml

Ajustar pH a 4
Filtrar con acrodisco de 0.2 μ m

CONCENTRACION DE HEPARINA DESEADA			
CONCENTRACION DESEADA EN EL MEDIO DE FERTILIZACION $\mu\text{g/ml}$	VOLUMEN DE HEPARINA STOCK-2 ml	VOLUMEN DE SOLUCION SALINA ml	CONCENTRACION FINAL mg/ml
0.2	0.1	9.9	0.005
1	0.5	9.5	0.025
2	1	9	0.05
4	1	4	0.1
6	1	2.3	0.15
8	1	1.5	0.2
10	1	1	0.25
12	1	0.66	0.3
16	1	0.25	0.4
20	1	0	0.5

HEPARINA-STOCK-1	
INGREDIENTES	
Heparina	50 mg
Solución Salina 0.9%	10 ml

Alicuotar en volumen de 1 ml

Almacenar a -80°C

HEPARINA-STOCK-2	
INGREDIENTES	
Heparina-Stock-1	1 ml
Solución Salina 0.9%	9 ml

Alicuotar en volumen de 1 ml

Almacenar a -80°C