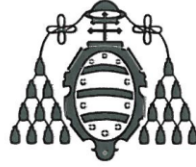


UNIVERSIDAD DE OVIEDO
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN

ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA
OVOCITARIA EN BOVINA PREVIA
A FECUNDACIÓN IN VITRO

TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR
Yaiza Martínez Martínez

JUNIO 2013



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

D. Antonio Gómez Peinado, director veterinario del **Instituto Español de Genética y Reproducción Animal**, en Talavera de la Reina.

INFORMA:

Que la alumna **Yaiza Martínez Martínez** ha realizado bajo su supervisión el Trabajo Fin de Máster titulado “**Análisis de la morfología ovocitaria en bovino previa a FIV**”, dentro del programa del Máster “**Biología y Tecnología de la Reproducción**”.

Dicho trabajo cumple con las directrices exigidas y por ello autoriza la presentación del mismo. Para lo cual firma la presente en Talavera de la Reina a 03 de junio de 2013.



El sello circular contiene el texto "Instituto Español de Genética y Reproducción Animal" en el borde superior, una ilustración de un paisaje con montañas y un sol en el centro, y el acrónimo "IEGRA" en el borde inferior.

Fdo. Antonio Gómez Peinado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Antonio Gómez Peinado por habernos acogido en su centro de manera altruista haciéndonos formar parte de su equipo durante un mes; también a todo el personal de IEGRA que nos han tratado como familia y nos han permitido sentirnos como en casa.

También quiero agradecer a Jimena González por haber sido parte de la aventura y por hacerme los días en Talavera livianos y divertidos.

A mis compañeras de Máster Paloma, Patricia y Diana que me han ayudado en lo que he necesitado y han hecho que este master además de aportarme conocimientos me aportara amistades.

INDICE ABREVIATURAS

BFS: Suero fetal bovino.

BSA: Seroalbumina bovina.

FIV: Fecundación in vitro.

FSH: Hormona folículo estimulante.

GAP: siglas inglés de proteína aceleradora de la actividad GTPasa.

HEPES: ácido libre

LH: Hormona luteínica

OPU: de las siglas en inglés de Ovum Pick Up.

PBS: Solución salina fosfatada buferada.

PHE: Penicilina, Hipotaurina y epinefrina.

SPSS: Programa informático de estadística.

SPZ: espermatozoide.

SVE: Suero de Vaca en Estro.

UI: Unidades Internacionales.

INDICE

I.	Introducción.....	6
II.	Objetivo general.....	16
III.	Material y métodos.....	16
	III.1 Ubicación.....	16
	III.2 Material biológico.....	16
	III.3 Clasificación ovocitos.....	18
	III.4 Maduración de los ovocitos.....	19
	III.5 Preparación semen.....	20
	III.6 Medio fertilización.....	21
	III.7 Cultivo de embriones.....	22
IV.	Análisis estadístico de resultados.....	23
V.	Resultados.....	24
VI.	Discusión.....	29
VII.	Conclusión.....	31
VIII.	Bibliografía.....	32

I.INTRODUCCIÓN

Las técnicas de producción de embriones *in vitro* así como su mejora ha dado lugar a un espectacular aumento en la transferencia de embriones de vacunos producidos con esta técnica.

En el año 2000 tan solo 42.000 embriones fueron producidos *in vitro* mientras que en el año 2005 ya se realizaron más de 265.000 y siendo notable el aumento de la misma y las tendencia es a que exista mayores incrementos en el futuro, dado que la producción *in vitro* ayuda a aumentar la selección genética, aumentar la fertilización y optimizar los cruces en ganado de carne con ganado de producción de leche, lo que permite transferir embriones de razas cárnicas en vacas de actitud láctea que no son destinadas a la cría.

Otras de las aplicaciones de la Fecundación *in vitro* en bovino es que permite obtener embriones a muy bajo coste, vacas con problemas de infertilidad por ovulación, fecundación o por muerte embrionaria precoz. Además de obtener embriones de animales enfermos o de avanzada edad.

Sin embargo existe alguna limitación y a gran escala es aún poco eficiente:

La viabilidad de los embriones producidos a partir de ovocitos obtenidos por aspiración es semejante a la alcanzada por embriones producidos por otros procedimientos *in vitro*, pero más baja que la obtenida en embriones producidos por lavado *in vivo*, obteniéndose de porcentajes de preñez que varían desde un 25 hasta un 45 % [1], Además calidad de los embriones obtenidos *in vitro* es menor que la obtenida *in vivo*

Existiendo diferencias morfológicas, contienen un mayor contenido en lípidos, siendo más oscuros y con menor densidad [2], los triglicéridos son los más abundantes [3] y una disminución del número de blastómeras especialmente en la masa interna [4], más frágil la zona pelúcida, la velocidad de desarrollo es mayor y espacio perivitelino menor [5] Existen también diferencias funcionales, existiendo anomalías en las uniones intercelulares, por la expresión que conforman las proteínas gap [6], así como más alteraciones de apoptosis, alteraciones en genéticas y cromosómicas con una alta incidencia de mixoploidia : células poliploides y normales [7].

Todos estos factores producen una reducción de potencial pre y post implantación, es más difícil su criopreservación lo que limita su conservación, tiene dificultades en el desarrollo embrionario, siendo un punto crítico en este estudio y además es menor el número de gestaciones llevadas a cabo que con técnicas *in vivo*.

Recolección de los ovocitos.

La forma más económica y común de obtener ovocitos es a partir de ovarios de matadero, por lo que existen abundantes conocimientos de aquellos factores que afectan a la recolección de ovarios.

Por ejemplo las temperaturas inferiores a los 30 °C durante el almacenamiento de los ovarios producen pérdidas en la transcripción y lesión de los orgánulos citoplasmático, los cuales van a ser mediadores importantes en el desarrollo embrionario temprano [8]. Este tiempo es igual de importante en el desarrollo, los ovarios pueden permanecer en solución salina a temperaturas entre 30 y 38 °C durante 8 horas sin afectar la calidad de los ovocitos.

Una vez recolectados los ovarios la obtención de los ovocitos se puede llevar a cabo por aspiración con jeringa o bien cortando el ovario, la aspiración se debe realizar en folículos superficiales mayores de 2mm, mientras que el método de corte consiste en colocar los ovarios en placas de Petri con medio de recolección de ovarios y cortar la superficie y el interior con un bisturí, haciendo cortes de 2mm de separación[9]. La aspiración de ovocitos se realiza con una jeringa de 5 o 10 ml y aguja hipodérmica estéril 18 G, posteriormente el líquido folicular es depositado en placas de Petri para buscar los ovocitos aspirados [10], comparando los dos medios de obtención de ovocitos existen estudios que demuestran que mediante el corte del ovario se obtienen ovocitos de mejor calidad para la fecundación *in vitro*, así como un mayor número, las tasas en la disminución de recuperación y producción de embriones en el caso de la aspiración folicular puede ser debido al efecto nocivo sobre el cumulus durante la aspiración [11].

De ovocitos obtenidos con el corte, se obtiene mayor número pero no todos alcanzan el tamaño adecuado para la maduración meiótica y desarrollo embrionario, ya que muchos son obtenidos de folículos de menor tamaño y no superficiales [12].

Entre la recuperación de ovocitos post mortem e in vivo hay pocas diferencias, existe un mayor control y facilidad en la punción post mortem del ovario, siendo más difícil la visualización por ecografía, con la donante viva, además, se ha reportado diferencias entre puncionar un ovario con una jeringa y aguja a la aspiración in vivo con una presión de vacío de aspiración ajustable [13], finalmente las ventajas en donantes vivas es el acceso a animales de alta calidad, ya que podemos coleccionar ovocitos repetidamente, incluso en estado de preñez, ayudando a establecer esquemas que permitan incrementar la eficiencia productiva. En el caso de de la aspiración transvaginal guiada por ultrasonidos Ovum Pick Up (OPU) el animal no tiene que tener un ciclo productivo normal, se puede repetir en el mismo animal durante 5 a 6 meses, con una periodicidad de dos aspiraciones por semana o una semanal, sin ningún efecto sobre la reproducción o sobre el bienestar animal [14], cuando se usa conjuntamente con técnicas de FIV, el intervalo generacional disminuye y aumenta la mejora genética maternal produciendo más prole que con métodos convencionales, la tasa de recuperación de ovocitos por OPU están influenciados por la aspiración al vacío antes mencionada, tratamientos hormonales del animal, frecuencia de punción, estado del ciclo, experiencia del operador, teniendo su efecto beneficioso o nocivo en la calidad del ovocito.

Clasificación de ovocitos

Una etapa crítica en el procedimiento de fertilización *in vitro* (FIV) es la elección de ovocitos de buena calidad para poder garantizar un óptimo desarrollo, los aspectos más importantes que evalúan la calidad del ovocito son: Estado nuclear, características citoplasmáticas, aspectos de la corona radiada y la expansión o distribución de las células del cumulus [15], así como el diámetro de los ovocitos, que condicionan su capacidad para madurar [16] de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 μm se encuentra todavía en fase de crecimiento y no han adquirido la capacidad para madurar.

La morfología del citoplasma y las células del cumulus son los primeros criterios para discriminar entre ovocitos competentes o incompetentes para el desarrollo embrionario, la calidad de las células que rodean el ovocito y la apariencia homogénea de citoplasma son los mejores indicadores para determinar si el ovocito posee potencial para madurar y fecundar in vitro [17], las células del cumulus son subpoblaciones de células de la granulosa que aportan los nutrientes al ovocito durante su crecimiento, participan en la formación de la zona pelúcida, y sintetizan la matriz compuesta de ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito a través del oviducto y permiten atrapar al espermatozoide para la fertilización [12].

Por lo tanto los ovocitos se pueden clasificar según estos criterios, según las capas de células del cumulus y la homogeneidad y apariencia del citoplasma, aunque las categorías de clasificación varían en número según los autores con importancia científica y para controlar la calidad de la producción y recolección de los ovocitos, existen clasificación de 2 [18], 3 [19] y 4 categorías, las que he valorado como más relevante, el tipo A corresponde a un ovocito con células del cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente; el tipo B tiene capas múltiples del cumulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras; el tipo C se caracteriza por tener un cumulus denudado y un citoplasma irregular con zonas oscuras; el tipo D tiene el cumulus con células expandidas y un citoplasma irregular y con zonas oscuras [10], Aunque por otra parte un ooplasma negro indica que el ovocito está envejecido y tiene bajo el potencial para soportar el desarrollo [20].

Otros estudios de cuatro categorías, por características morfológicas son a nivel ultraestructural y por su capacidad de desarrollo en un sistema de maduración in vitro, en la categoría 1 y 2 los orgánulos son distribuidos de manera uniforme. Mientras que en la 3 y 4 los orgánulos imitaban las características de los ovocitos durante la maduración final, en la categoría 1 las células del cumulus penetraban el córtex del ovocito o se encontraban superficiales al mismo, mientras que en la categoría 4 en la mayoría no penetraba.

Después de la maduración *in vitro* sólo la categoría 4 mostraba una disminución de la capacidad de desarrollo, mientras que la categoría 1 y 3 mostraron semejante capacidad de desarrollo en la maduración *in vitro* [21].

Existe una relación directa entre el desarrollo del ovocito y el número de células que lo rodean[22]. Ovocitos desnudos aislados de folículos antrales y cultivados solos o sobre monocapa de células de la granulosa tienen un desarrollo deficiente[23] o degeneran después de la fertilización[24], otros estudios demostraron que los ovocitos desnudos aún pueden conservar la capacidad de desarrollo normal [25], en general se considera el número de 5 capas, de cúmulus que rodean al ovocito, como el número relevante. [19], Observaron que ovocitos con 3 capas desarrollaron significativamente menos al estadio de blastocisto (23%) que los que poseían mayor número de capas (40%), estos resultados son todos obtenidos en laboratorio tras punción de ovarios post- mortem.

A nivel prácticos se deberán cultivar solo ovocitos que tenga un cumulus denso, con un mínimo de 5 capas que cubran toda la superficie del ovocito, que su citoplasma sea de color gris oscuro uniforme y sin manchas.

La selección de los ovocitos previa a la maduración en bovinos fue reportada inicialmente por Leibfried y First (1979) [26], que demostraron que la capacidad de maduración nuclear *in vitro* no dependía del tamaño del folículo ni del momento del ciclo estral de la hembra, pero sí las características morfológicas de los ovocitos para su maduración en cultivo.

Maduración *in vitro*

La técnica de fecundación *in vitro* desde la maduración de los ovocitos de procedencia bovina es exitosa en la fertilización en el desarrollo embrionario.[27].Se han desarrollado distintos medios desde soluciones simples de sales balanceadas hasta medios complejos para la maduración de ovocitos, tomando como referencia los componentes que están presentes *in vivo*, para proporcionar las condiciones ideales, con el fin de obtener el mayor porcentaje de ovocitos madurados.

Algunos factores a tener en cuenta en la maduración son osmolaridad, pH y hormonal:

Hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), estrógenos (estradiol), células somáticas para co-cultivo (células del cúmulo, granulosa, teca interna, oviducto, útero, células del hígado de rata búfalo), aminoácidos, factores de crecimiento, suero de vaca en estro, suero fetal bovino (BFS), y seroalbumina bovina (BSA) [27].

El medio M-199 es el que generalmente se emplea en la maduración de ovocitos, y normalmente está suplementado con gonadotropinas (FSH/LH), estradiol, suero sanguíneo y piruvato, el cual da altas frecuencias de maduración nuclear y expansión del cumulus cuando se agrega FSH [17], además el piruvato sódico permite prescindir de las células del cúmulo durante la maduración, puesto que se han obtenido blastocistos competentes para producir terneros viables tras la transferencia embrionaria utilizando este compuesto [28].

Las gonadotropinas son necesarias para la maduración y desarrollo de los ovocitos. La LH afecta a la maduración del ovocito, altera la concentración de calcio dentro del ovocito, aumenta la glucólisis y la oxidación mitocondrial de la glucosa dentro del ovocito. La FSH estimula la actividad aromática de las células de la granulosa, haciendo que el ambiente folicular androgénico a estrogénico [29]. Además, la FSH incrementa la expansión de las células del cúmulo [27],

Los estrógenos se necesitan para la maduración de los ovocitos, sensibilizan los receptores de las células de la granulosa para responder a las gonadotropinas; utilizando células de la granulosa como co-cultivo, no es necesario añadir estrógenos al medio de cultivo [30]. Hay efectos favorables del estradiol en el medio de maduración, el cual llega a ser evidente en el día 7 del estadio de desarrollo del embrión [27].

El suero de vaca en estro, el BFS y la BSA son fuentes proteicas, de aminoácidos y también contienen hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y otras sustancias que el ovocito y el embrión requieren para su desarrollo [27], Se sabe que las células somáticas utilizadas para co-cultivo secretan ciertos factores que favorecen la maduración normal del ovocito, aumentan la fertilización y el desarrollo embrionario.

Aparte de los medios de cultivo también es necesario aportar un ambiente lo más similar posible a aquel en el que los ovocitos maduran de forma natural. Para ello hay que considerar: La concentración de oxígeno en el ambiente, la de CO₂ (5%)) la

humedad relativa (95-100%), la osmolaridad de los medios utilizados (290 mOsm), el pH de los medios (7.4), y la temperatura, tanto a la que se procesan como a la que se cultivan (38,5 °C) [31].

Existe una serie de procesos fisiológicos, que condicionan éxito o el fracaso del siguiente paso en la fecundación *in vitro*.

Tras la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros cultivados, alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16-24 horas de comenzar la maduración. Alrededor del 80% de estos, es fecundado y comienzan a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto o blastocisto expandido luego del cultivo durante 6-7 días. Esto indica que el cultivo embrionario, correspondiente al paso más comprometido dentro del proceso de producción *in vitro*, donde existe el mayor porcentajes de pérdidas del sistema. A su vez, durante esta etapa, se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos [32]

Capacitación de semen

En la fecundación *in vitro* si utilizamos semen congelado debemos utilizar una serie de protocolos que nos permiten la separación de espermatozoides vivos de los muertos, los sistemas son :

Gradiente de densidad de Percoll [33]

Método de lavado por centrifuga, washing [34]

Filtración mediante columna de vidrio [35]

Método de migración/ sedimentación [36]

Cada vez se utiliza más el gradiente de densidad de Percoll, por el alto porcentaje de espermatozoides móviles, con morfología normal y viables que se recuperan.

Así mismo también permite la eliminación de residuos citotóxicos de crioconservantes y los espermatozoides muertos por lo que hace aumentar el porcentaje de fecundación [33], siendo menor el número de radicales libres que oxiden el medio de cultivo.

Otro de los componentes importantes que se debe agregar a los espermatozoides es la heparina es importante en la capacidad fecundante in vitro de espermatozoides de bovino [34].

Fertilización

Consiste en la interacción entre los componentes del ovocito y los del espermatozoide, activándose la segunda división meiótica del ovocito y la restauración del número cromosómico del futuro individuo. La descondensación de la cabeza del espermatozoide ocurre dentro de 1 a 2 horas de haber penetrado al ovocito, y el pronúcleo masculino se forma de 3 a 5 horas [27]. La concentración espermática en la FIV es de 0.5 a 1 millón de espermatozoides por mililitro [27] y para lograr un buen porcentaje de fertilización hay que incubar por 24 horas después de la maduración y fertilización [27]. Si se observan los 2 cuerpos polares dentro del gameto femenino quiere decir que se llevó a cabo la fertilización.

La fertilización generalmente se realiza en microgotas de HEPES, a un pH de 7.8. También se utiliza PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) como estimulante de la motilidad espermática [27]. Antes de la fertilización generalmente se retiran las células del cúmulus de los ovocitos maduros, y este proceso se puede realizar por pipeteo como en nuestro caso o con la adición de citrato de sodio al 3%, sin provocar ningún daño, para limpiar al ovocito [27].

Se mantiene los ovocitos con los espermatozoides durante 24 h en 5 % CO₂, no es necesario corregir el Ph, ya que los buffers carbonatados corrigen el pH.

Hipotaurina- epinefrina: La adición de una catecolamina como la epinefrina y un aminoácido sulfonado como la hipotaurina al medio de cultivo es beneficioso para la fertilización en vacuno, las catecolaminas aumentan la motilidad espermática y la hipotaurina ayuda a la reacción acrosomal, estos componentes son encontrados también in vivo por lo que se puede pensar que tiene importancia en el tracto reproductivo de la hembra.

Cultivo de embriones

El número de embriones eclosionados o desarrollados está asociados significativamente con el estado de desarrollo del embrión y éste con el medio de desarrollo.

La evaluación de los embriones se lleva a cabo a lo largo de los días de desarrollo:

1 célula: día 0-1	Blastocisto: día 7-8
2 células:día 2	Blastocisto expandido: día 8-9
4 células: día 2-3	Blastocisto eclosionado: día 9-10
8 células:día 2-4	
16 células: día 4-5	
Mórula temprana: día 5-6	
Mórula compacta: día 6-7	

Los medios de cultivo deben aumentar la eficiencia metabólica, por lo que deben ser una fuente de energía, los primeros tres días de desarrollo la existencia de piruvato es esencial para ello, siendo negativa la adición de glucosa. Otra fuente de energía son los aminoácidos tanto esenciales, que estimulan el desarrollo durante la división como los no esenciales, que lo estimulan a partir de las 8 células, [37], estos además de aportar energía, también ayudan a mantener el pH, por ser una fuente importante de ácidos nucleicos .

Existen numerosos estudios sobre la aportación de suero bovino como fuente de proteína, este suero es variable en su composición química, por lo que se les puede atribuir efectos negativos a nivel mitocondrial [38], aumento en la producción de lactato, células oscuras y de aspecto granulado en la masa celular interna, [39], menor síntesis proteica[40]. Menor compactación de las morulas así como bastantes semejanzas entre los blastocistos in vivo y los que se obtienen in vitro sin suero. [41]

La gestación pueden ser más prolongada,[42] y la cría puede ser mayor de lo normal [43].

Existen diversos estudios que demuestran que la morfología ovocitaria influye en la maduración del ovocito así como en la fertilización.

Un estudio realizado por De los Reyes determina que dependiendo de las categorías ovocitarias evaluadas por su morfología (siendo el cúmulus y el citoplasma

las características más influyentes) con técnicas no invasivas incrementará la maduración *in vitro*.

Divide en 6 categorías los ovocitos, obteniendo con las categorías 1 y 2 tasas de maduración de 75,3% y 68,6% respectivamente y las categorías 4 y 5 obtuvieron tasas de maduración de 55,5% y 47,2%, las categorías que obtuvieron las menores tasas de maduración fueron la 6 y 3 (30,9% y 34,9%) [43]

La posibilidad de maduración *in vitro* es independiente al ciclo estral y al tamaño de folículo..[26]

Otros estudios demuestran que la eliminación de todas las células de la corona y del cumulus en bovino está relacionado con una disminución del reinicio de la meiosis, así como el papel que juega las células del cúmulus sobre la actividad del ovocito[44]

Otros comparan la morfología ovocitaria con la fertilización y aquellos con 2-6 células del cumulus tienen mayores tasas(76,9%) mayor que en aquellos con menos células o desnudos (55,7-14,7%), sin embargo indican que es necesario criterios más estrictos.[45]

Otros estudios señalan que en general, del 10 al 40 % de los ovocitos maduros llegan a blastocisto, y de estos solo el 5-20 % llega a gestación, otros señalan un 52% se divide después de la fertilización y un 26% alcanza el estado de blastocisto, además de indicar la necesidad de tener un alto número de ovocitos para aumentar el porcentaje de gestaciones. [46]

La calidad de los ovocitos por tanto es un factor muy importante para la producción de embriones *in vitro*, y los criterios de elección de la calidad se basan en el número de capas de células del cumulus que rodean el ovocito además de un citoplasma homogéneo, siendo indicadores de su madurez y su desarrollo embrionario.

II.OBJETIVO GENERAL

Análisis morfológico de ovocitos obtenidos post mortem, estableciendo un patrón de clasificación que permita establecer categorías diferenciadas para identificar aquellos con los que se obtenga mayor fertilización y desarrollo embrionario dependiendo de dicha morfología.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 Ubicación

El estudio se realizó en el laboratorio de fertilización in vitro dentro del Instituto Español de Genética y Reproducción Animal

III.2 Material biológico

Se recolectaron ovarios de vacas y novillas en el matadero ubicado en la población de Toledo, los 120 ovarios recolectados fueron transportados al laboratorio en PBS 1000 ml con penicilina 30000 UI y estreptomicina 100 mg.

Preparamos el medio de lavado y la maduración de los ovocitos, una hora antes de empezar el trabajo

MPM 8 ml y SVE (suero de vaca en estro) esterilizado por medio de filtración.

El MPM está compuesto por:

L- aglutinina 10 mg

Na HCO₃ 80mg es necesario porque Hepes neutraliza en parte NaHCO₃

Hepes 140 mg

Lactato de Ca 60 mg diluir previamente en agua millipore

Piruvato de Na 25 mg
Gentamicina 100 μ l
TCM 199 (liq) ad 100 ml bufferado con NaHCO_3

El medio de maduración consiste en la adición de FSH / 1 ml MPM con SVE (Suero de vaca en celo)

Colocamos 400 μ l de medio de maduración en cada well, cubierto con parafina líquida y equilibrado en la estufa de cultivo durante una hora.

Con el volumen producido cargamos una placa de Petri de 35 mm de diámetro, 4 Wells (aproximadamente 400 μ l, y dejar el resto para diluir el líquido folicular, con los ovocitos obtenidos, en una placa de Petri de 130 mm de diámetro.

En el momento de la obtención los ovarios los lavamos una vez con la misma solución y colocados en el termo. Antes de comenzar la punción repetimos el lavado de los ovarios con PBS+ Antibiótico (2 o 3 veces) y preparamos el medio de maduración en las placas a fin de estabilizar la temperatura y el Ph. La punción de los ovarios y la aspiración de los ovocitos lo realizamos de forma manual con una aguja

Todos los folículos que no presentan indicios de atresia folicular, entre 2 y 8 mm de diámetro, son aspirados, en folículos de mayores dimensiones se obtienen ovocitos degenerados o sobremadurados., dejamos reposar 20 min, recogemos sedimento con parte de líquido folicular y lo depositamos en placas petri de 15 cm de diámetro con 2-3 ml de medio de lavado. Depositamos los ovocitos recolectados, primero en una placa petri (3 cm de diámetro) y lavados cuatro veces más por medio de lavado (pasado cada ovocito por las cuatro cubetas Well).

Una vez lavados seleccionamos los ovocitos, teniendo un total de 206 ovocitos recolectados en 4 visitas al matadero.

III.3 Clasificación de ovocitos

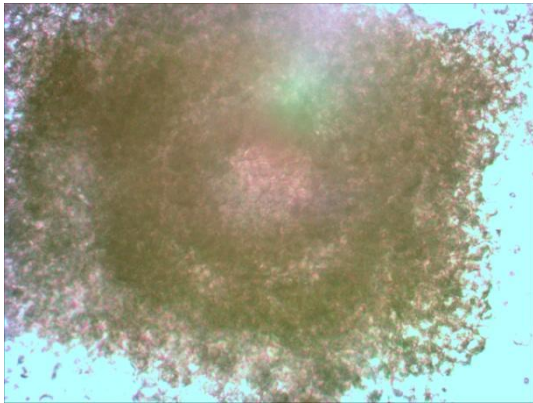
A corresponde a un ovocito con células del cumulus con número de capas múltiples (mayor a 4) y compactas, con citoplasma homogéneo y transparente;

B tiene capas múltiples del cúmulus (de 1 a 3) y un citoplasma homogéneo con zonas periféricas oscuras.

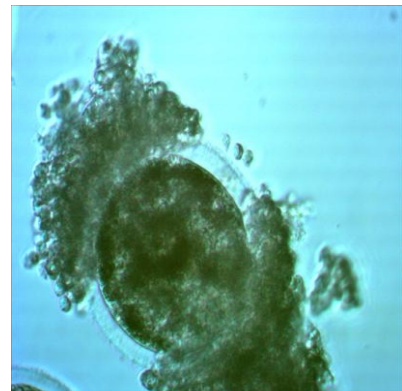
C se caracteriza por tener un cumulus desnudo y un citoplasma irregular con zonas oscuras. El D tiene el cumulus con células expandidas y un citoplasma irregular y con zonas oscuras

Clasificación propuesta por Lonergan y colaboradores, en 1991.

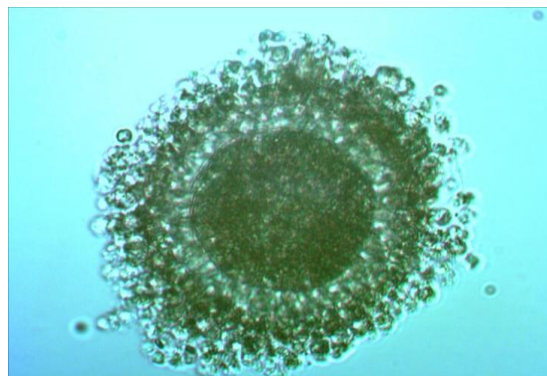
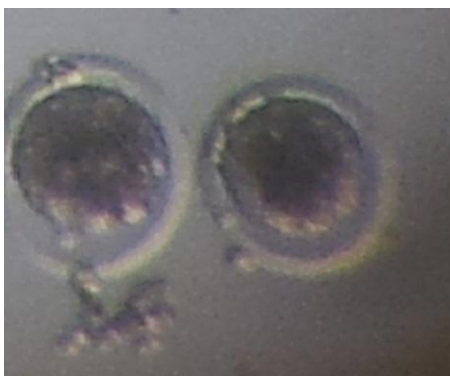
Ilustraciones realizadas en el estudio sobre las categorías ovocitarias:



Ovocito calidad A



Ovocito calidad B



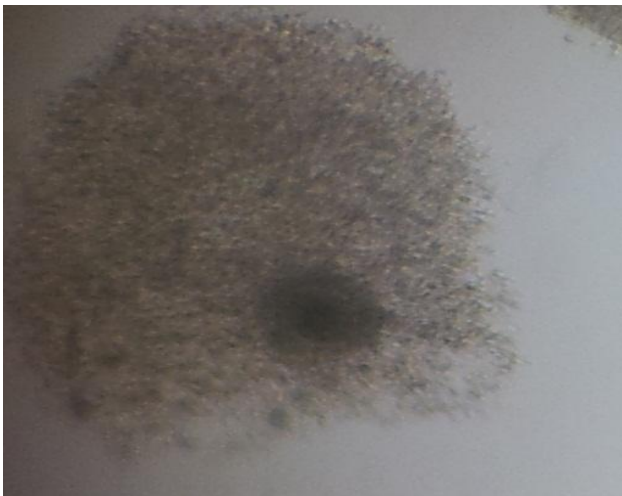
Ovocitos Calidad C

Ovocito calidad D

III.4 Maduración de ovocitos

Separamos en distintos pocillos los ovocitos dependiendo de la calidad de los mismos, y tras 24 horas en la estufa obtenemos unos resultados de maduración.

Los ovocitos maduros poseen una capa de células granulosas. El indicador para seleccionar un ovocito maduro es la presencia de un citoplasma homogéneo así como un corpúsculo polar recientemente extruido. Esta última es una característica distintica de los ovocitos maduros de animales domésticos y es indicativa de la detención del gameto femenino en metafase II de la meiosis. La extrusión del corpúsculo polar se registra en el bovino a partir de las 16 horas de iniciada la maduración in vitro alcanzando su máximo nivel entre las 22-24 h, y otro indicador es la expansión de las células del cumulus. En esta etapa no descartamos ningún ovocito



Ovocito madurado in vitro. Ilustración tomada en el estudio.

III. 5 Preparación del semen

Separación por gradientes para lo que utilizamos un medio comercial BovinePure

Se necesita Bovine pure 100, BoviDilute, medio de lavado de semen, microtubos 1, 5 ml para centrifuga, pipetas dispensadoras y puntas desechables, pipetas Pasteur y la microcentrifuga.

Componentes para 500 μ l:

Concentración 40 % bovinepure 100 200 μ L y de bovidilute 300 μ L

Concentración 80 % bovinepure 100 400 μ L y de bovidilute 100 μ L

Utilizando el siguiente protocolo:

Incubar a 38°C al menos 30 min con los tubos cerrados...

Con una pipeta estéril, transferimos 500 μ L de Bovipure 80 % al microtubo de centrifuga

Con una nueva pipeta estéril, transferimos 500 μ L de Bovipure 40% en la capa superior de la capa interior, sin perturbar el gradiente.

Después de descongelamos la pajueta (0,25 ml) lavamos y vaciamos su contenido lentamente en el gradiente. Evaluamos la motilidad del espermia inicial con una pequeña muestra del semen descongelado.

Centrifugamos a 300 G durante 15 min a temperatura ambiente, después de centrifugar retiramos el sobrenadante, asegurando que solo quede el pellet.

Transferimos el pellet en un nuevo tubo que contenga 1 ml de solución Boviwash, centrifugar nuevamente esta vez 5 min, y de nuevo eliminamos el sobrenadante.

Medimos el volumen del pellet, tomamos 5 μ l del pellet y añadimos a 250 μ l del medio final de FIV a fin de evaluar la motilidad final y añadimos otros 5 μ l de pellet en 250 de agua para evaluar la concentración total en una cámara de recuento Neubauer

Calculamos la concentración correcta en las gotas de FIV (1×10^6 spz/ml)

Lavamos los ovocitos 2 veces en los medios de FIV y transferimos 10 μ l del pellet en las gotas de FIV donde esperan los ovocitos.

III.6 Medio Fertilización

Para la fertilización utilizamos una variante propuesta por A. Palma [47]

TL- stock 10 ml

BSA 60mg

Piruvato stock

TL STOCK 100ml NaCl 666 mg KCl 23,5 mg
 NaHCO₃ 210,3 mg NaH₂PO₄H₂O 4,7mg
 Penicilina 6,5 mg NaLactato (jarabe 60%)186 µl
 Rojo fenol 1mg MgCl₂ 6 H₂O 10 mg
 CaCl₂ 2H₂O 39,7 mg Anhidra Glucosa (al final) 30 mg
 Medir la osmolaridad (280-300 mOsm), esterilizar por
 medio de filtración, conservación 2 semanas.

Una vez preparado el medio de fertilización, 10 ml. A este medio no es necesario corregir el pH, pero si es importante meterlo en la estufa (5% CO₂) a fin de que los buffers carbonatados corrijan el Ph, las cubetas deben ser cubiertas con parafina ≈ 400µl

A los 400µl /Wells de medio de fertilización se le incorpora 30 µl de la solución final de heparina y 15µl de la solución de hipotaurina-epinefrina, poco antes de incorporar los espermatozoides.

Cultivamos los ovocitos con los espermatozoides a 39°C 5% CO₂ con elevada humedad durante 24 horas.

III.7 Cultivo de embriones

El ovulo fecundado y denudado se pasa a un medio compuesto por SOFaa, BSA, SVE. Glutamina y aminoácidos esenciales y no esenciales.

SOFaa

NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , Rojo fenol, Na piruvato, Na lactato y glutamina

Se mantiene en este medio durante 48 horas para su desarrollo.

IV. ANALISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS:

El análisis estadístico realizado en este trabajo se realizó mediante el programa estadístico SPSS (Chicago, Illinois), para la comparación de datos con distribución no paramétrica se utilizó el test de chi cuadrado.

Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como indicativos de significación estadística.

V. RESULTADOS

Obtenemos en el matadero 120 ovarios, obtenemos 311 ovocitos de calidad A obtenemos 84 ovocitos de los cuales no maduran 20(23,8 %), de calidad B tenemos 106 ovocitos de los que no maduran 31 (29,24), de calidad C obtenemos 81 y no maduraron 35 (43,20%) y de calidad D obtuvimos 40 ovocitos y no maduraron 19 (47,5%).

Contingencia Calidad- maduran	MADURACIÓN		Total
	NO MADURA	MADURA	
A	20	64	84
B	31	75	106
C	35	46	81
D	19	21	40
Total	105	206	311

		NO MADURA	MADURA		
CALIDAD	A	Recuento	20	64	84
		% dentro de CALIDAD	23,8%	76,2%	100,0%
		% dentro de MADURACIÓN	19,0%	31,1%	27,0%
		% del total	6,4%	20,6%	27,0%
	B	Recuento	31	75	106
		% dentro de CALIDAD	29,2%	70,8%	100,0%
		% dentro de MADURACIÓN	29,5%	36,4%	34,1%
		% del total	10,0%	24,1%	34,1%
	C	Recuento	35	46	81
		% dentro de CALIDAD	43,2%	56,8%	100,0%
		% dentro de MADURACIÓN	33,3%	22,3%	26,0%
		% del total	11,3%	14,8%	26,0%
D	Recuento	19	21	40	
	% dentro de CALIDAD	47,5%	52,5%	100,0%	
	% dentro de MADURACIÓN	18,1%	10,2%	12,9%	
	% del total	6,1%	6,8%	12,9%	
Total	Recuento	105	206	311	
	% dentro de CALIDAD	33,8%	66,2%	100,0%	
	% dentro de MADURACIÓN	100,0%	100,0%	100,0%	

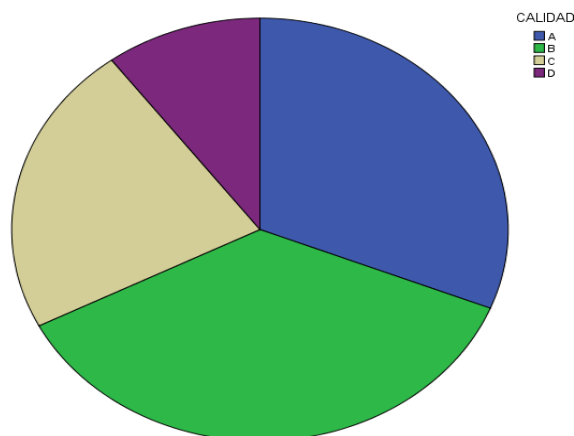
% del total	33,8%	66,2%	100,0%
-------------	-------	-------	--------

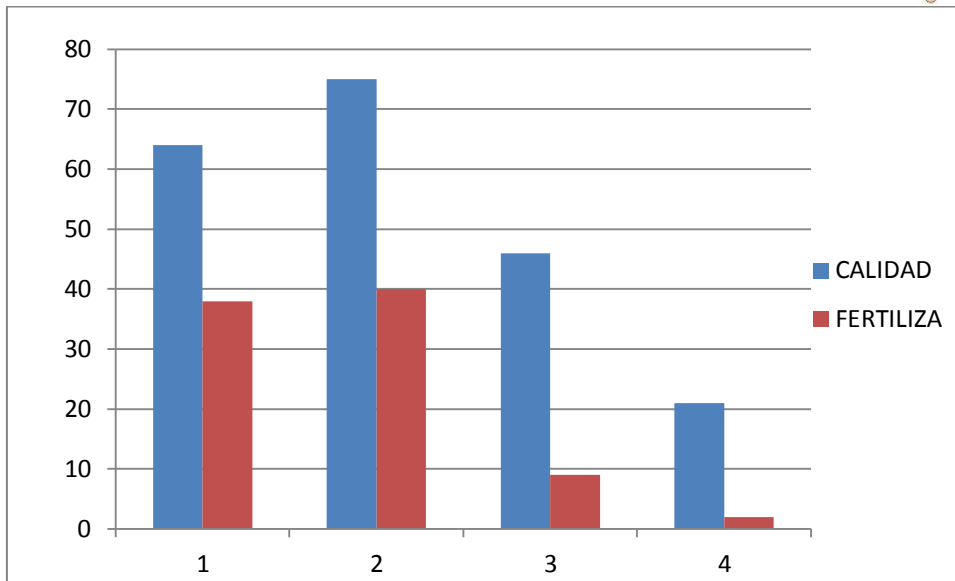
Chi-cuadrado	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,296 ^a	3	,010
Razón de verosimilitudes	11,262	3	,010
Asociación lineal por lineal	10,623	1	,001
N de casos válidos	311		

- a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5.
La frecuencia mínima esperada es 13,50.

Por lo que podemos determinar que existen diferencias significativas entre unas categorías y otras en relación a la maduración, con una $p < 0.05$. Un 66,7% del total de ovocitos recolectados han madurado.

De los ovocitos madurados tenemos 206 ovocitos de los cuales 64 son de calidad A (con más de 4 células de cumulus y citoplasma regular, 75 son de calidad B (Con 1- 3 células de cumulus y citoplasma con poca irregularidad) de calidad C (cumulus denudada y citoplasma irregular) 46 ovocitos y por último de calidad D (cumulus expandido con citoplasma irregular y oscuro) 21 ovocitos.





Relacionando la calidad con la fertilización se puede ver que tanto en el grupo A y B existe una mayor cantidad de ovocitos fértiles que en el grupo 3-4 (C y D)

TABLA RELACIÓN CALIDAD Y FERTILIZACIÓN		FERTILIZACIÓN		Total
		NO FERTILIZO	FERTILIZO	
A	Recuento	26	38	64
	Frecuencia esperada	36,0	28,0	64,0
	% dentro de CALIDAD	40,6%	59,4%	100,0%
	% dentro de FERTILIZACIÓN	22,4%	42,2%	31,1%
	% del total	12,6%	18,4%	31,1%
	B	Recuento	35	40
Frecuencia esperada		42,2	32,8	75,0
% dentro de CALIDAD		46,7%	53,3%	100,0%
% dentro de FERTILIZACIÓN		30,2%	44,4%	36,4%
% del total		17,0%	19,4%	36,4%
C		Recuento	36	10
	Frecuencia esperada	25,9	20,1	46,0
	% dentro de CALIDAD	78,3%	21,7%	100,0%
	% dentro de FERTILIZACIÓN	31,0%	11,1%	22,3%

	% del total	17,5%	4,9%	22,3%
	Recuento	19	2	21
	Frecuencia esperada	11,8	9,2	21,0
D	% dentro de CALIDAD	90,5%	9,5%	100,0%
	% dentro de FERTILIZACIÓN	16,4%	2,2%	10,2%
	% del total	9,2%	1,0%	10,2%
	Recuento	116	90	206
	Frecuencia esperada	116,0	90,0	206,0
Total	% dentro de CALIDAD	56,3%	43,7%	100,0%
	% dentro de FERTILIZACIÓN	100,0%	100,0%	100,0%
	% del total	56,3%	43,7%	100,0%

De los 64 ovocitos calidad A 38 fertilizaron (59,4%) , de los 75 ovocitos de calidad B fertilizaron 40 (53,3%), de calidad C 46 fertilizaron 10 (21,7%) y de calidad D 19 fertilizaron 2 (9,5%) del total de ovocitos por tanto nos fertilizaron 90 y no fueron fertilizados 116 (43,7% de éxito en todas las categorías)

CHI CUADRADO CALIDAD-FERTILIZACIÓN	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	28,209 ^a	3	,000
Razón de verosimilitudes	30,810	3	,000
Asociación lineal por lineal	25,159	1	,000
N de casos válidos	206		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9,17.

Chi- cuadrado de Pearson es menos a 0.05 por lo que existen diferencias significativas entre las diferentes calidades respecto a la fertilización.

Aquellos que fueron fertilizados pasaron a medio de cultivo de embriones de los cuales ninguno llego a más de 3- 4 días (8 células)

De los 38 fertilizados de calidad A sólo 10 llegaron a día 4

De los 40 fertilizados de calidad B fueron 9 los que llegaron a día 3-4

De los 9 fertilizados de calidad B 1 llegó a día 3-4

De los 2 fertilizado de calidad D ninguno llegó a día 3-4.

RESUMEN DE CASOS RELACIÓN CALIDAD- EMBRIÓN	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
CALIDAD * EMBRION	206	100,0%	0	0,0%	206	100,0%

CONTINGENCIA CALIDAD- EMBRION	EMBRION		Total
	NO	SI	
A	54	10	64
B	66	9	75
C	45	1	46
D	21	0	21
Total	186	20	206

Del total de 206 ovocitos sólo 20 llegaron a embrión día 3-4

CHI CUADRADO CALIDAD- EMBRION	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,242 ^a	3	,041
Razón de verosimilitudes	11,129	3	,011
Asociación lineal por lineal	7,622	1	,006
N de casos válidos	206		

a. 2 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,04.

Chi-cuadrado de Pearson es inferior a 0.05 por lo que existen diferencias significativas si relacionamos las distintas calidades con el desarrollo embrionario.

VI. DISCUSIÓN

Se debe considerar que la técnica FIV es posible realizarla de manera exitosa en bovino, aunque aún presenta deficiencias respecto a las técnica in vivo, en la mayoría de protocolos de producción de embriones, entre el 15 y 50% de los ovocitos madurados llegan a blastocisto, en nuestro trabajo no se ha llegado a blastocisto en ningún ovocito madurado aunque si se ha conseguido una tasa de fertilización dentro de lo reportado, La poca eficiencia de desarrollo a blastocisto podemos relacionarla con la fabricación de los medios en nuestro laboratorio sin ser comerciales, los cuales no precisan de la misma esterilización que los comerciales, en los pocillos de fertilización se nos produjo una ligera contaminación que también lo atribuyo a la lenta manipulación en los procedimientos lo que puede conllevar a una mayor exposición de luz y atmósfera no idónea para el desarrollo de los mismos. Además de utilizar suero bovino como componente de los medios, los cuales algún autor considera nocivo a nivel mitocondrial, además de su composición no específica.

El 43,7% (90) de los ovocitos maduros tienen éxito en la fecundación in vitro y continúan con la subsiguiente división embrionaria a estadio de 2 blastómeras 24-48h después de la fecundación. Sin embargo, 7 días post-fecundación, ninguno de nuestros ovocitos inmaduros alcanzan el estadio de blastocisto.

En estudios con tasa del 80% de fertilización, los cuales de un 25 a un 40% alcanzan el estadio de blastocisto [32] parten de una buena morfología ovocitaria por lo que podemos ver que aún siendo de calidad los ovocitos sólo el 25-40 % de los embriones en división alcanzaron el día 7.

En el trabajo realizado he obtenido datos significativos entre las diferentes categorías de ovocitos calificados por morfología., de calidad A y B existe un mayor

tasa de fertilización además de ser las dos categorías que integran el mayor número de embriones obtenidos, dándole importancia al rol que juega las células del cumulus en el reinicio de la meiosis y la morfología ovocitaria en la selección de los mismos para una correcta obtención de embriones. Los ovocitos desnudos serán incapaces de responder a la LH y FSH, ya que las células del cumulus son los mediadores del efecto de las mismas sobre el ovocito.

De calidad A y B obtenemos porcentajes de fertilización (59,4% y 44%) respectivamente comparada con el 76,9% reportada en otros artículos[45]. Mientras que en los ovocitos de calidad C y D obtenemos porcentajes de fertilización notablemente más bajos (21,7% y 9,5%), por lo que sí que son relevantes los resultados obtenidos comparados con estudios como el de De los Reyes et al, 1999) cuyos porcentajes son más elevados en las calidades superiores, pero existen semejantes diferencias entre estos grupos y los que son de peor calidad.

Por lo que podemos corroborar que la maduración y desarrollo in vitro no depende del ciclo estral de la hembra, pero sí de las características morfológicas, como demuestra Leibfried y First.

Todos los factores que influyen en el desarrollo fueron estudiados con precisión según la bibliografía, factores hormonales, aportación de energía y nutrientes y fueron incluidos en nuestros protocolos de actuación, así como una buena selección de semen viable mediante el método de Percoll, por lo que obtuvimos unos buenos resultados de maduración (66,2%) y dentro de la media de fertilización (43,7%).

VII. CONCLUSIONES.

Puedo concluir que el estudio de la valoración morfológica de los ovocitos es importante en la fertilización in vitro, considero poco eficiente la técnica empleada ya que no hemos conseguido desarrollar blastocitos, el tamaño muestral en otros estudios son más amplios por lo que quizás el número de ovocitos estudiados ha sido bajo, viendo que los datos indican la necesidad de tener un alto número de ovocitos para aumentar el porcentaje de desarrollo y de lo más importante y que no debemos olvidar que es la gestación final.

Considero que los porcentajes han sido significativamente diferentes tanto en la maduración, en la fertilización como en el desarrollo embrionario relacionándolos con las categorías ovocitarias correspondientes como pretendía corroborar con el objetivo de este trabajo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

[1]Kruip T.A., Boni R., Wurt Y.A., Roelofsen M.W.M., Wurth Y.A., Pieterse M.C. 1994. Potencial use of Ovum Pick Up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 42: 675-684.

[2]Massip A, Mermillod P y Dinnyes A 1995.Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implications for their cryo- preservation. *Human Reprod* 10: 3004–3011.

[3]Khurana NK, Niemann H.2000.Effects of quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54: 741-756.

[4]Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP., Lonergan P.2002.Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 62: 320-327

[5]Thompson, J. G., Allen, N. W., McGowan, L. T., Bell, A. C., Lambert, M. G. and Tervit, H. R. 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology* 49:1239–1249.

[6] Boni, R., Tosti, E., Roviello, S. and Dale, B. 1999. Intracellular communication in in vivo and in vitro produced bovine embryos, *Biol. Reprod.* 61:1050– 1055.

[7] Slimane, W., Heyman, Y., Lavergne, Y., Humbolt, P. and Renard, J.P. 2000. Assessing chromosomal abnormalities in 2-cell bovine in vitro- fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. *Biol. Reprod.* 62:628- 635.

[8]Sekine J., Sakurada,T., Oura, R.1992.Optimum temperatura of ovarian transportation for in vitro fertilization of bovine oocytes. *Veterinary record*,131:372.

[9]Seneda ,M.M., Esper, C.R.,Garcia,J.M.,Oliveira,J.A., Vantini,R.2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery.*Animal Reproduction science*,67: 37-43.

[10] Lonergan, P., Vergos, E., Kinis, A., Sharif, H., Gordon, I. 1991. The effect of recovery method on the type of bovine oocytes obtained for IVF. *Theriogenology*, 35:231.

[11] Hamano, S., Kuwayama M. 1993. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of the individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39: 703-712.

[12] Arlotto, T., Schwartz, J.L., First, N.L., Leibfried, M.L. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 45: 943-956.

[13] Hashimoto, S., Takaruna, R., Kishi, M., Sudo, T., Minami, N., Yamada, M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows *Theriogenology* 51: 757-765.

[14] Kruip, T.A., Boni, R., Wurt, Y.A., Pieterse, M.C. 1993. Application of OPU for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 39: 251

[15] Chen, S., Lien, Y., Cheng, Y., Chen, H., Yang, Y. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws and grids. *Human reproduction*, 16:2350-2356.

[16] Sato, E., Matsuo, M., Miyamoto, H. 1990. Meiotic maturation of bovine oocyte in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 1. *J. Anim. Sci.* 68:1182-7.

[17] Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., First, N. L. 1986. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod.* 35:850-857

[18] Younis, A. I., Brackett, B. G., Fayer-Hosken, R. A. 198. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.* 23:189-201.

- [19] Hawk, H.W., Wall, R.J., 1994. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41 (8), 1571–1583.
- [20] Nagano, M., Katagiri, S. and Takahashi, Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote* 14: 53–61.
- [21] De Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P., Kruip, T. 1989. Morphology of immature bovine oocytes gamete Res. 24: 197-204.
- [22] Hirao, Y. N. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Reprod. Fert* 100: 333-339.
- [23] Eppig JJ. 1979. A comparison between oocyte growth in coculture with granulosa cell- oocytes junctional contact maintained in vitro *J Exp Zoo* 209, 345.
- [24] Osaki, S., Matsumura, K., Yamamoto, K., Miyano, T., Miyake M., Kato, S. 1997. Fertilization of bovine oocytes grown in vitro. *Reprod Fert Devel.* 9: 781-787.
- [25] Dominiko., First. Maturation of denuded bovine oocytes result in normal fertilization and development *Biol Reprod.* 44:353.
- [26] Leifried, L., First, N. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim. Sc* 48:76-83.
- [27] Gordon, I., y K.H. Lu. 1990. Production of embryos in vitro and it's impact on livestock production. *Theriogenology* 33:77-87.
- [28] Geshi, M., Takenouchi, N., Yameuchi, N., Nagai, T. 2000. Effect of sodium piruvate in nonserum maturation medium o maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biology of reproduction*, 63: 1730-1734.
- [29] Hazeleger, N.L., D. J. Hill, R.B. Stubbings y J.S. Walton. 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 43:502-509.
- [30] Xu, K.P., H.C. Greve, y P. Hyttel. 1987. Co-culture of granulosa cells with or without estrogens. *J. Reprod. Fertil.* 81: 501-504.

- [31] Watson,A.J., De Sousa,P., Caveney,A., Barcroft,L.C., Natale,D., Urquhart,J., Westhusin,M.E. 2000. Impact of bovine oocytes maturation on oocytes transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biology of reproduction*,62: 355-364.
- [32] Lonergan, P.,Rizos,D., Kanka,L., Nemcova,L., Mbaye,AM., Kingston,M., Wade,M., Duffy,P., Boland,M. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction* 126,337–346.
- [33]De los Reyes,M.,Almendra,C., Berland,M.,Del Campo,H.,Barros,C.1996. Selection of frozen bull spermatozoa for in vitro fertilization. *Archivos de medicina Veterinaria*,28:31-38.
- [34]Parrish,J.J.,Krogenaes,A., Susko-Parrish,J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim—up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*,44: 859-869.
- [35]Stabbing,R.B.,Wosik,C.P.1991. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization. *Theriogenology*,35: 276.
- [36] Risopatron,R., Sanchez,R., Sepulveda,N.,Pena,P., Villagran,E.,Miska,W.1996. Migration sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization- comparison with washing. *Theriogenology*,46: 65-73.
- [37] Thompson, J., Gardner, D.,Pugh,PA., McMillan,W., Tervit,E. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53,1385-1391.
- [38] Dorland, M., Gardner,DK.,Trounson,AO., 1994. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *J Reprod Fert* 13,70.
- [39] Krisher ,RL.,Lane,M., Bavister,B. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod* 60,1345-1352.
- [40] Kuran, M., Robinson,JJ., Staines,M.,McEvoy,T. 2001. Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. *Theriogenology* 55, 593-606.
- [41] Crosier, AE., Farin,P., Dykstra,M., Alexander,J., Farin,C. 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod* 64,1375-1385.

[42] Farin,P.,Crosier,A., Farin,C. 2001. Influence of *in vitro* system on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55,151-170.

[43]De los Reyes, M.,Aguayo J.P., Del Campo,H., Barros,C. Cows oocytes evaluation for cultura maturation.*Avances en ciencias veterinarias*.1999.14: 1-2.

[44]Sirard, M.A., Parrish,J.J Ware, C.B Leibfried,L First,N.1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol.Reprod*.39: 545-552.

[46]Arav, A. 2001. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology*, 55:1561-1565.

[47]Palma,G.A.2001. Transferencia de embriones y Biotecnología de la reproducción en la especie bovina,54:185-213.