

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Evaluación de Cinco Suplementos Utilizados para
la Maduración IN VITRO de Ovocitos Bovinos

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Ana María Rizo González

DIRECTOR DE TESIS:

M.V.Z. MC Fco Javier Padilla Ramírez

ASESOR DE TESIS:

M.V.Z. Juan Jesús Roa Vidal

Guadalajara Jalisco Junio 1993

15664/016543
V909-A7
M

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE CINCO SUPLEMENTOS UTILIZADOS PARA LA
MADURACION IN VITRO DE OVOCITOS BOVINOS

TESIS QUE PRESENTA:

PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO Y
ZOOTECNISTA

ANA MARIA RIZO GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS:

MVZ. MC. FCO. JAVIER PADILLA RAMIREZ

ASESOR DE TESIS:

MVZ. JUAN JESUS ROA VIDAL

GUADALAJARA, JALISCO. JUNIO 1993

CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN.....	A
INTRODUCCION.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
JUSTIFICACION.....	19
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL Y METODOS.....	22
RESULTADOS.....	31
DISCUSION.....	40
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45

RESUMEN

A

Actualmente México esta pasando por una etapa de cambios y ajustes económicos, políticos, sociales y de relaciones internacionales con el fin de superar el subdesarrollo del país. El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara. El objetivo fué la evaluación de cinco suplementos utilizados para la maduración in vitro de ovocitos bovinos. Se realizaron varios ensayos previos para la estandarización de la técnicas de: Colección de ovarios, Colección y clasificación del Complejo Cúmulus Ovocito (CCO), Maduración de ovocitos in vitro (MIV). Una vez dominadas estas técnicas se procedió a realizar un ensayo en el que se utilizaron ovocitos clasificados como A y B y se distribuyeron al azar para la maduración in vitro de 50 CCO para cada uno de los cinco tratamientos. La variable de respuesta fue de acuerdo al grado de expansión de las células del cúmulus. El análisis estadístico utilizado fue el de Chi cuadrada de contingencia de dos por dos, donde se evaluaron las diferencias entre tratamientos. El promedio de la aspiración fue de 5.02 CCO viables a madurar. Para la MIV se observó que la FSH - LH Schering y Pergonal utilizados como suplementos al TCM - 199 maduraron (expandieron) un mayor porcentaje ($P > 0.05$) de ovocitos, comparados con los tratamientos de suero de vaca en estro, gonodotropina coriónica humana y suero fetal bovino. En conclusión se dice que tanto el pergonal como la FSH son suplementos efectivos en la maduración de ovocitos in vitro.

INTRODUCCION

Actualmente México está pasando por una etapa de cambios y ajustes económicos, políticos, sociales y de relaciones internacionales con el fin de superar el subdesarrollo del país. Lo cual crea la necesidad de ajustes oportunos para poder proporcionar alternativas viables y acordes en las diversas áreas mencionadas.

Una gran variedad de problemáticas estan presentes y demandan soluciones factibles adcaudas a las necesidades de desarrollo interno y de intercambio de comercio internacional, tecnológico y de servicios.

El crecimiento de la población en México que asciende a 81,249,645 habitantes en 1990 (18) demanda un crecimiento y actualización de tecnología propia, que permita el avance en la producción con fin de bajar los costos de los productos y permita la comercialización. Las relaciones internacionales de comercio que actualmente vive nuestro país esta entrando a una nueva etapa de posibilidades que permitirá el flujo de bienes y servicios producidos entre los países de Norteamérica (Canadá, Estados Unidos y México).

Los sistemas de producción se ven afectados por diversos factores dentro de los cuales se encuentran una pobre economía, un bajo desarrollo tecnológico y un alto costo al adaptarla, un bajo consumo de los productos y un lento proceso en la exportación.

A la vez la industria pecuaria demanda también estos cambios en los sistemas de producción, ya que los problemas que la acojen son entre otros, los de un bajo consumo de sus productos alimenticios como lo es la carne, por el pobre poder adquisitivo ligado a los bajos salarios.

Uno de los renglones que más incide en la producción pecuaria es la reproducción, la cual se encuentra en una etapa de desarrollo y transformación, posibilitado por el desarrollo biotecnológico como son: Inseminación Artificial, Transferencia de Embriones, Producción de Mellizos, Clonación, Producción de Embriones in vitro, entre otras.

De las aplicaciones o beneficios para la producción de embriones in vitro se pueden enumerar los siguientes: Esta técnica provee un gran número de embriones para ser transferidos comercialmente y producir becerros. En Europa y Japón el valor de becerros lecheros es bajo comparado con los becerros producidos para carne, siendo esto un indicativo al transferir los embriones tipo carne usando vacas lecheras como nodrizas. Por otra parte es económicamente factible la clonación de embriones por transferencia nuclear, requiriendo que la enucleación de ovocitos sea producido in vitro a partir de ovarios recuperados del rastro y que el nuevo cigoto sea desarrollado in vitro hasta una etapa apropiada para la clonación. (12)

La producción de embriones in vitro requiere principalmente del desarrollo de tecnología en tres áreas: Maduración de ovocitos foliculares in vitro, Fertilización in vitro y Cocultivo de embriones in vitro.

Historia del ovario.

Aristóteles (384-322 AC) describió el útero, mas no reconoció la existencia de los ovarios. (21). La descripción hecha por Aristóteles del desarrollo embrionario del pollo en el huevo se remonta al año 340 AJ. (5)

Dutchman Regnier de Graaf (1641-1673). Graaf es principalmente recordado hoy por el descubrimiento de los folículos. Indudablemente la mayor contribución de Graaf fué la primera descripción exacta del cuerpo luteo, creía que el folículo era todo el huevo.(8). Graaf observó pequeñas cavidades en el útero de la coneja y dedujo que no podían haber sido secretadas por el utero sino que debían preceder de los organos que llamó "ovarios". (23)

W. Hunter, investigó aspectos de reproducción en hombres y animales, Willian diseccionó cerca de 400 uteros humanos grávidos, el tenía en sus libros interesantes comentarios de como se hacía el cuerpo luteo durante la preñez. (25)

CUCEBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Los ovarios de la vaca miden normalmente de 3.5 a 4 cm. de longitud, 2.5 cm. de ancho y tienen alrededor 1.5 cm. de grosor en su posición mayor; el peso es de unos 15 gr. a 20 gr. tiene forma oval, apuntadas al extremo uterino y no tiene fosa de ovulación. A menudo se pueden observar varios folículos de distintos tamaños, que se proyectan desde la superficie, así como cuerpos lúteos; un cuerpo lúteo de una vaca preñada tiene un color amarillo fuerte y puede alcanzar una anchura de 1.5 cm. hay que indicar, que muchos casos sólo una pequeña parte del cuerpo lúteo se muestra sobre la superficie del ovario, su totalidad esta oculta en el interior de la glándula. El tamaño del ovario esta afectado por el cuerpo lúteo. (30)

El ovario a diferencia del testículo permanece en la cavidad abdominal y lleva a cabo funciones exócrinas (liberación del huevo) y endócrinas (esteroidogénesis) (6). Durante el desarrollo fetal las oogonias se producen por multiplicación mitótica, posteriormente viene la primera división meiótica hasta que se forman varios millones de ovocitos, proceso que se detiene en la profase. Luego la atresia reduce la cantidad de ovocitos en el momento del nacimiento, y en la pubertad se produce una disminución posteriormente, de manera que sólo están presentes unos cuantos cientos durante la etapa final reproductiva. Al nacimiento, una capa de células foliculares rodea los ovocitos primarios en el ovario, de ellas se forman los folículos primordiales. Al principio estos se encuentran diseminados por todo el ovario, pero durante la

vida neonatal temprana se van disponiendo sólo en la zona cortical. La forma y tamaño del ovario varía con la especie y el estadio del ciclo estrual. (17)

Los ovarios de la vaca tienen forma ovoidal y se localizan en la cavidad del peritoneo frente a la cara del arco pélvico. Su posición es lateral y se encuentra aproximadamente al nivel de la mitad de la abertura pélvica. (32)

Ciclo estrual de la vaca.

En los bovinos, la pubertad varía considerablemente según la raza y las condiciones de la nutrición. Las terneras Holstein presentan su primer estro en promedio al cumplir la edad de 37 semanas, siempre que estén bien alimentadas; a las 49 semanas si las condiciones en este respecto son intermedias; y a las 72 semanas en animales mal nutridos. La pubertad parece ocurrir cuando la vaquilla tiene aproximadamente dos tercios del tamaño adulto.

La duración del ciclo estrual es en promedio 20 días en las vaquillas y de 21 a 22 días en las vacas adultas.

El período de estro puede definirse como el tiempo que ésta tolera ser montada por un toro o por otra vaca. Este período dura en promedio aproximadamente 18 horas y es un tanto menor en vaquillas. El intervalo normal es de 12 y 24 horas. La ovulación ocurre normalmente después de 10 a 15 horas de haber terminado el estro de la vaca. (13)

La función sexual de los mamíferos está determinada, en gran parte, por la actividad de la hormona gonadotrófica de la hipófisis. (GTH).

La hipófisis está sometida a control, por medio de factores liberadores (RF), también llamados hormonas liberadora (RH), o factores inhibidores (IF ó IH) del hipotálamo el cual, a su vez depende del influjo de gobierno de determinadas regiones del encéfalo que reciben informaciones sensoriales del organismo y del ambiente, las elaboran y las transmiten. (31)

El ciclo ovárico está regulado por una secuencia específica de hormonas gonadotróficas secretadas por la hipófisis, estas hormonas son individualmente reconocidas como hormona foliculo estimulante, hormona estimulante de células intersticiales u hormona luteinizante y prolactina u hormona luteotrófica. Cada una de estas hormonas influye sobre el ciclo ovárico.

La hormona foliculo estimulante (FSH) estimula la proliferación de las células de la teca interna y, probablemente las células de la membrana granulosa; sólo responden los folículos que han madurado el desarrollo en el antrum; a través de esta hormona FSH, uno o más de ellos alcanzan el estado de foliculo vesicular con cada ciclo estral. La FSH no incide sobre el desarrollo folicular cuando éste ha alcanzado el estadio de foliculo vesicular. El posterior desarrollo de este foliculo es dependiente de la hormona luteinizante u hormona estimulante de

Muy poco después de que la FSH haya iniciado el crecimiento de los folículos, la hipófisis comienza a secretar LH, para producir la proliferación de las células de la teca interna y posiblemente también las de la membrana granulosa; este estímulo combinado hace que las células de la teca interna, y probablemente las de la membrana granulosa, secreten estrógenos, lo cual da como resultado el rápido desarrollo de los folículos. (30)

Fisiología del desarrollo folicular.

En los mamíferos, el desarrollo folicular sólo llega a cierta etapa durante el desarrollo embrionario y no vuelve a iniciarse sino hasta que se ha alcanzado la madurez sexual. (35)

El crecimiento folicular y la maduración en el ovario representan una serie de transformaciones subcelulares y moleculares de diversos componentes del folículo como el ovocito, la granulosa y la teca, que dependen de varios factores intraováricos, factores intrafoliculares y señales hormonales que producen la secreción de andrógenos y estrógenos (principalmente estradiol). En el crecimiento folicular intervienen proliferación y diferenciación inducidas por hormonas de células de la teca y de la granulosa, las que al final aumentan su capacidad de producir estradiol y responder a las gonadotropinas hipofisarias. La producción de estradiol determina qué folículo estimula los receptores de LH necesarios para la ovulación y luteinización.

La reanudación del desarrollo folicular depende en parte de la secreción de gonadotropinas hipofisiarias, especialmente de la FSH.

Al ovocito primario lo rodea una capa simple de células aplanadas de células mesodérmicas "células foliculares". En este estadio se le conoce como folículo primordial, por tanto un folículo primordial contiene un ovocito primario; estos se conocen también con el nombre de folículos aquiescentes y son localizables en grupos distribuidos libremente. La activación del folículo primordial da por resultado el folículo primario. Una acumulación de gránulos de vitelo se observa dentro del ovocito primario, las células foliculares se vuelven cuboidales. El folículo primario contiene un ovocito primario.

El folículo secundario situado más profundamente (15) se identifica por un aumento en la población de células foliculares rodeando al ovocito primario y el desarrollo de una zona pelúcida entre el ovocito primario y las células foliculares.

El desarrollo del folículo secundario (folículo vesicular) resulta de la actividad secretora de las células de la granulosa. Se desarrollan unas fisuras intercelulares, para formar el antro folicular, el cual se llena de licor folicular. Las células de la granulosa que rodea al ovocito se conoce como cúmulus oophorus. Las células de este cúmulo que se encuentran de inmediato al ovocito primario reciben el nombre de corona radiada, estas células tienen procesos que penetran en la zona pelúcida y hacen contacto con las microvellosidades del huevo. (35)

El ovocito está altamente especializado para un desarrollo independiente con grandes reservas de nutrientes; su citoplasma contiene reservas nutricionales en forma de yema el cual es rico en lípidos y proteínas. El recubrimiento de los ovocitos es especializado de forma extracelular, consistiendo de largas moléculas de glucoproteínas algunas secretadas por el ovocito y otras por las células que lo rodean; el ovocito contiene otra capa externa inmediata rodeando la membrana del plasma del huevo es llamada zona pelúcida, esta capa protege al ovocito de daños mecánicos. (1) (ver figura 1)

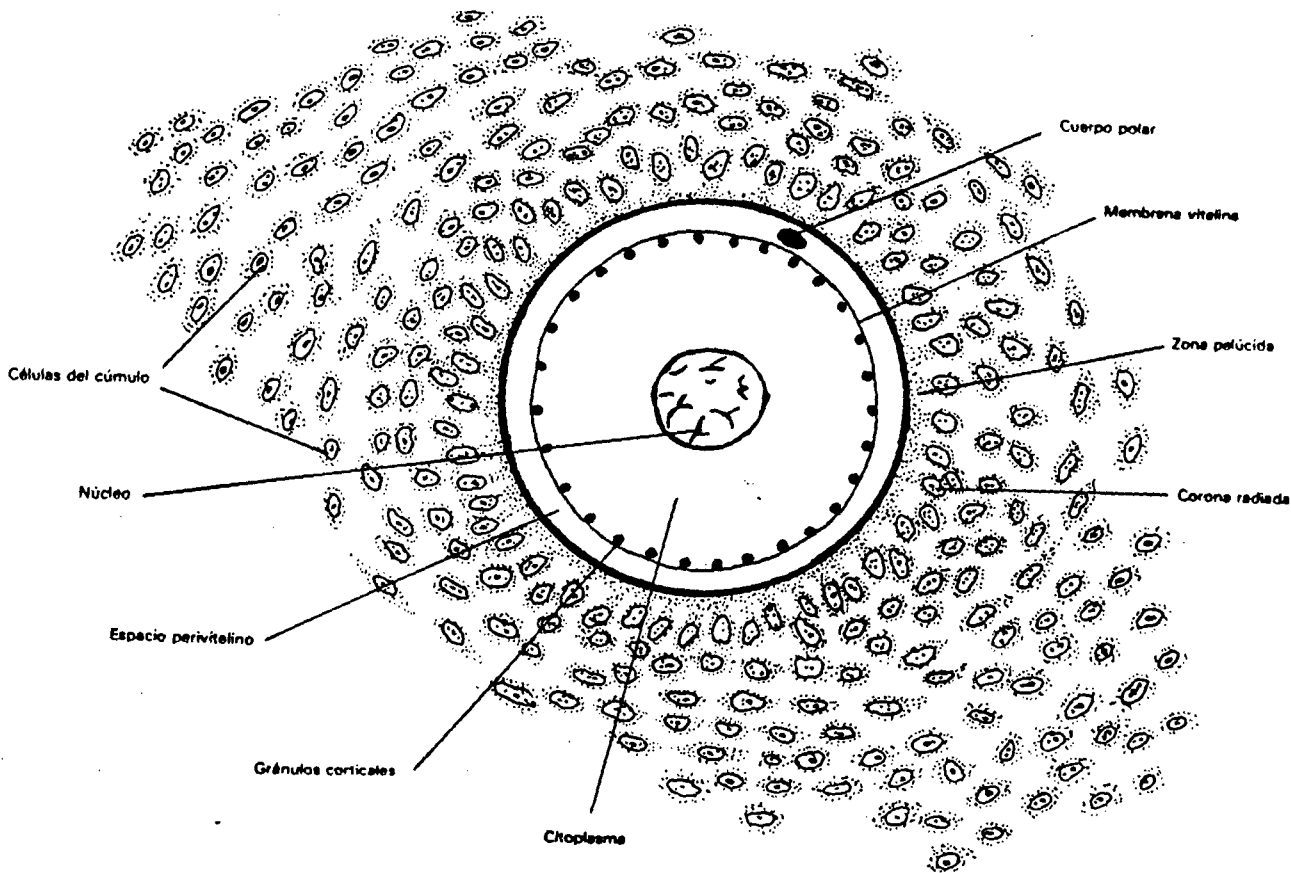
Crecimiento del ovocito a través de diversos mecanismos especiales:

Dentro de los ovarios los ovocitos toman de la yema las proteínas a partir del fluido extracelular mediante un receptor mediador en endocitosis.

Dos tipos de células accesorias del ovario funcionan en esta vía de ovogénesis. Las "células enfermeras" que circundan y son usualmente conectadas por un puente citoplásmico a través de las cuales las macromoléculas pueden pasar directamente dentro del citoplasma del ovocito; las otras células accesorias en el ovario que ayudan a nutrir desarrollando a los ovocitos son las "células foliculares", estas están dispuestas como una capa epitelial alrededor del ovocito, y están conectadas por una unión en forma de garganta, la cual permite el cambio de pequeñas moléculas pero no macromoléculas, solamente suple las macromoléculas a moléculas más pequeñas.

FIGURA No.1

ESQUEMA DE UN OVOCITO CON LAS PARTES QUE LO CONSTITUYEN



Las células accesorias circundantes hacen una contribución adicional al desarrollo del ovocito, ésta es la célula accesoria que responde a las hormonas polipéptidas, llamadas gonadotropinas, éstas liberan al ovocito a partir de profase I que facilita la maduración. (1)

Uno de los cambios más dramáticos que ocurre en los folículos de Graaf en mamíferos justo antes de la ovulación es la expansión o mucificación de las células del cúmulus (10).

La primera vez que se observó una fertilización fué hace más de cien años por Herman Fol, (zoólogo suizo) en un huevo de estrella de mar. (9)

Desde los años cincuentas los sistemas de cultivo que mantienen la fertilización y desarrollo temprano in vitro del óvulo de mamíferos han sido desarrollados y perfeccionados, haciéndose esto posible gracias al estudio de las interacciones del espermatozoide y el óvulo de mamíferos. (16)

La fertilización in vitro (FIV) de ovocitos bovino fué reportada por primera vez en 1977 por Brackett. El nacimiento normal de un becerro producido a través de fertilización in vitro fué dado a conocer por Brackett en 1982 utilizando óvulos recuperados de hembras superovuladas; en años posteriores diferentes autores reportan de igual manera terneros nacidos por medio de FIV. Hanada en 1985 lo logró usando ovocitos inmaduros de una vaca del rastro, cultivado en oviducto de conejo (transferido temporariamente) y transferido el embrión en un estado de mórula a la nodriza por un método no quirúrgico. En 1987 se logró estabilizar el sistema de cultivo in vitro con un cultivo de células del cúmulus, donde se desarrolló hasta el estado de blastocisto. (14)

En los últimos años, la transferencia de embriones ha evolucionado notablemente, pasando de una simple herramienta de investigación en los laboratorios de las universidades a convertirse en una realidad a nivel de campo, con gran potencial en

el mejoramiento genético animal, especialmente en la especie bovina. El estudio de embriología animal comienza en el año de 1672 cuando Regnier Graaf observó por primera vez un embrión de conejo (23). En 1840 se describieron las características de los ovulos de la oveja y poco después en la perra (1845) y la venada (1854). En 1897 se observaron los primeros embriones de cerdo, de gato en 1911; de seres humanos en 1928; de vaca en 1931 y de la yegua hasta 1939. (2)

MADURACION

Los folículos de Graaf contienen ovocitos primarios que normalmente completan su desarrollo morfológico de acuerdo con el siguiente orden de sucesión en respuesta a la elevación preovulatoria de LH: a) La membrana nuclear (vesículo germinal) se destruye. b) El ovocito secundario se forma al completarse la primera división meiótica y con la expulsión del primer cuerpo polar. Poco después se forma la metafase para la segunda división meiótica. c) Ovulación y rotura del folículo. En 1935 Pincus y Enzmann descubrieron que el ovocito que se obtenía de un folículo de Graaf de conejas antes de la elevación de LH y que se situaban en un medio de cultivo adecuado maduraban en forma espontánea. En años recientes esto se ha confirmado para varias especies, sin embargo, la elevada frecuencia de anomalías cromosómicas y deficiencias citoplasmáticas, indican que este proceso no siempre es normal. Los ovocitos pueden madurar completa o parcialmente in vitro y suelen ser fecundados in vivo. (17)

En los ovocitos viejos, la frecuencia de poliespermia es elevada. Si el ovocito es muy viejo, el desarrollo embrionario es anormal o la fecundación no se produce. El óvulo sufre cambios complejos de maduración conocidos como meiosis antes de que este listo para la fecundación. Estos cambios empiezan durante la vida fetal y solamente llegan a completarse después de la ovulación y de la penetración del espermatozoide. (17)

La maduración es tradicionalmente definida como aquellos eventos asociados con la iniciación y ruptura de la vesícula germinal (GVBD) y completarse la primera división meiótica, refiriéndose hasta aquí como maduración nuclear. (20)

Los experimentos con animales han demostrado que con sólo extirpar un ovocito ovárico preovulatorio (dictioteno) del folículo y colocarlo en un medio de cultivo por 36 horas se inducen las fases finales de la maduración, exactamente como si se hubiera inyectado LH a la hembra. Esto sugirió que probablemente el intervalo entre la secreción preovulatoria de LH y la ovulación también fuera de 36 horas aproximadamente. (3)

La maduración de los ovocitos de mamífero tiene dos etapas: a) un período de crecimiento y b) un período de preparación final del núcleo y el citoplasma requerida para la fertilización y el desarrollo normales. Mediante proyecciones celulares, las células internas del cúmulus, colaboran en el crecimiento del ovocito, pues establecen contacto íntimo con la membrana de éste. (17)

En 1989 se utilizó para problemas de infertilidad en humanos un producto que contiene gonadotropinas LH, FSH; llamado Pergonal; induciendo procesos de ovulación con inyecciones de 150 UI por día.

(4)

En el mismo año Younis maduró ovocitos in vitro utilizando medio TCM-199 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20%; suero de vaca en estro; y suero de vaca en diferentes etapas del ciclo estrual al 20% respectivamente; se observó un desarrollo óptimo con suero de vaca en proestro adicionando FSH ó LH. Sin embargo se obtuvieron altos resultados (97.4%) de embriones alcanzando el estado de 8 células. (36)

En 1990 en un trabajo realizado por Sambuisso, adicionando suero de vaca en estro (SVE) y (SFB) al medio obteniendo un incremento en el porcentaje de maduración de ovocitos, por encima de la que obtuvo al utilizar sólo el medio Ham s F-10, obteniendo un 62.8% de ovocitos en Metafase II. (28)

También en 1990 la maduración de ovocitos in vitro de bovino cultivados en TCM-199 con 10% de SVE por 24 horas a 39 C con 5% de CO₂, se observó el más alto porcentaje de maduración siendo un 46% de maduración en comparación al uso de SVE al 15% y 20% teniendo una maduración del 30 y 31% respectivamente. (19)

En el mismo año Saeki cultivó ovocitos bovinos in vitro inmaduros en un medio libre de sueros conteniendo FSH disponible comercialmente, conteniendo también un microgramo/ml de estradiol 17B. Posteriormente los ovocitos fueron fertilizados y cocultivados in vitro utilizando tejido epitelial oviductual para el desarrollo de los blastocistos. Los resultados demostraron que la FSH podría ser usada para la próspera maduración de ovocitos in vitro de bovino con subsecuente producción de embriones bovinos, obteniendo en sus resultados un 76% de penetrabilidad. (27)

Los eventos morfológicos asociados con una maduración in vitro son similares a aquellos que ocurren in vivo excepto que los procesos in vitro se producen más rápidamente que in vivo. Debe ser recalcado que la maduración in vitro dan ovocitos con desarrollo y capacidad reducidos en comparación con los ovocitos madurados in vivo. La apariencia macroscópica de los folículos puede también ser usada para seleccionar ovocitos capaces de madurar y desarrollarse. (16)

El papel de la Maduración in vitro (MIV) y la Fertilización in vitro (FIV) para la producción lineal de embriones para la investigación e Industrial es clara, ya que estas técnicas son utilizadas para tratamientos de infertilidad, y MIV será un tratamiento necesario especialmente para ovocitos inmaduros.

Maduración in vitro ha llegado a ser un proceso próspero, especialmente cuando se le adicionan hormonas como la FSH y LH y varios tipos de sueros como el SFB y el SVE.

La técnica de maduración de ovocitos in vitro de bovino, como parte del sistema lineal para la producción de embriones, no cuenta con estudios que propongan una técnica eficiente y adecuada a las condiciones de nuestro país. La importancia reside en las correlación tan alta que existe entre una buena maduración y un buen porcentaje de fertilización. A la vez que su bajo nivel de investigación y desarrollo lo limita, y lo hace dependiente de tecnología extranjera, por lo cual es necesario desarrollar y proponer una técnica aplicable en nuestro país, ya que es de suma importancia una maduración adecuada para su posterior fertilización.

Aun cuando hay investigaciones recientes acerca de los sistemas de maduración in vitro con una gran variedad de medios básicos, el desarrollo de pruebas en la suplementación de la maduración se encuentra todavía con cierto grado de controversia. Así mismo, los trabajos que se refieren a la suplementación están hechos bajo diferentes criterios en su gran mayoría, y no se confrontan unos con otros al utilizar diferentes suplementos. De este modo el presente trabajo establecerá las bases para optar por los suplementos más eficaces en base a su capacidad de favorecer la maduración de ovocitos y determinar ésta por el grado de expansión observada en los mismos.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Es cierto que la secreción súbita de gonadotropinas induce la ovulación, e in vitro la maduración de ovocitos se debe a la adición de estas hormonas utilizadas en estudios previos, como lo son FSH Schering de origen de cerdo; se espera que utilizando FSH-LH en forma de Pergonal de origen de mujer postmenopausica en proporción de uno a uno, adicionado a un medio de maduración rico en nutrientes para el cultivo de células in vitro (TCM-199), se podrán obtener resultados similares. En cuyo caso se daría la oportunidad de conseguir en México la hormona necesaria y no depender del producto procedente del mercado extranjero.

Objetivo General:

- 1.- Evaluar diferentes suplementos al medio TCM-199 en la maduración in vitro de ovocitos de origen bovino.

Objetivos Particulares:

- 1.- Evaluar el efecto en la utilización de FSH, LH; HCG; Pergonal; Suero Fetal Bovino; Suero de Vaca en Estro; en TCM-199, en la maduración in vitro de ovocitos de origen bovino.
- 2.- Evaluar el desarrollo de las células del cúmulus, expresada en expansión de las mismas.
- 3.- Medir las diferencias estadísticas entre suplementos por una prueba de contingencia.

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara. Dicho laboratorio cuenta con la infraestructura suficiente para realizar la técnica de maduración de ovocitos in vitro de bovino. El estudio se realizó en el período comprendido entre los meses de Julio y Septiembre de 1992.

El soporte de material biológico fué suministrado por el Rastro Municipal de Guadalajara, que se encuentra localizado aproximadamente a unos 20 Km. del Laboratorio. Para trabajar se utilizaron ovarios procedentes de vacas de diferentes genotipos, de los cuales predominan el cruzado con cebú. El material incluyó ovarios tanto de vacas como de vaquillas.

Una vez hecha la aspiración y clasificación del complejo cúmulus ovocito (CCO) como A y B se distribuyeron al azar para la maduración de 50 CCO para cada uno de los cinco tratamientos.

Protocolo de Trabajo.

A continuación se describen los procedimientos para cada uno de los componentes del protocolo: (26) (29)

-Preparación para la colección de ovarios.

Se prepararon de 3 a 5 litros de Solución Salina Fisiológica al 0.9% de NaCl y se esterilizaron en autoclave. En el día de la colección se agregaron 100,000 UI de Penicilina y 100 mg. de Estreptomicina por litro de solución salina, también se elevó la temperatura a 39 C procediendo a la colección en el rastro.

-Colección de Ovarios.

Se colectaron los ovarios inmediatamente después del sacrificio de los animales directamente de las canales. Se removió el exceso de tejido, después se lavaron con solución salina fisiológica a 38°C varias veces con una piseta. Después se colocaron dentro de un termo con la misma solución donde se transportaron al laboratorio dentro de 2 a 3 horas posteriores a la colección, procurando tener la temperatura de 38°C.

COLECCION Y CLASIFICACION DEL CCO

-Procedimiento para la aspiración del CCO.

Una vez que los ovarios se recibieron en el laboratorio previamente limpio y desinfectado con solución antiséptica, se lavaron de 2 a 3 veces con solución salina fisiológica a 38 C. Posteriormente se colocaron a baño maria con la misma solución, en vasos de precipitado de 500 ml. a 38° C. Antes de la aspiración los ovarios se secaron con toallas de papel estériles. Hecho este procedimiento se tomaron con la jeringa de 5 ml con aguja de calibre 18 ó 20, aproximadamente 1 ml de medio TALP-Hepes antes de

proceder a aspirar los folículos, puestos previamente unos guantes estériles. Los folículos que se aspiraron medían de 2 a 8 mm de diámetro. Una vez aspirados se depositaron suavemente junto con el medio en cajas de Petry para su posterior búsqueda y clasificación del CCO. La búsqueda se realizó a través del microscopio estereoscópico. Esta fase del protocolo se efectuó con la ayuda de un técnico de laboratorio de genética.

CLASIFICACION DE OVOCITOS INMADUROS.

Para la clasificación de ovocitos se utilizó un microscopio estereoscópico de 400 aumentos. Esta fase del protocolo la realizó una sola persona.

Los criterios para la clasificación de los ovocitos fueron:

CLASIFICACION

CARACTERISTICAS

- | | |
|---|---|
| A | Ovocitos completamente rodeados con tres ó más capas de células del cúmulus compacta. |
| B | Ovocitos rodeados por una monocapa de células del cúmulus compacta. |
| C | Ovocitos parcial o totalmente desnudos. |
| D | Ovocitos rotos, deformes, o rodeados de fibrina. |

El día de la aspiración se preparó y esterilizó el medio para la maduración de los ovocitos (TCM-199), por medio de la filtración con microporo de .22 micras. Posteriormente se colocaron en cajas de Petry de 35 mm gotas de este medio, (100 microlitros). Antes de colocar los ovocitos en este medio se preincubó por espacio de dos horas en la estufa con 5% de CO₂ y a 38 C. El mismo procedimiento se realizó para el medio TALP-Hepes.

Se preparó una pipeta modificada, que consistió en ajustar el diámetro de dicha pipeta y bordes de la misma al tamaño del ovocito con las células del cúmulus, con el fin de que al momento de la aspiración no se dañen estas últimas. Antes de transferir los ovocitos al medio de maduración se lavaron de dos a tres veces con el medio TALP-Hepes, hecho lo anterior se transfirieron todos los ovocitos clasificados con las categorías A y B. Esta transferencia se llevó a cabo a las gotas de maduración TCM-199 las cuales después se cubrieron con aceite mineral con el fin de evitar la evaporación.

Se colocaron 25 ovocitos en cada gota de medio de maduración, con un total de 50 ovocitos por tratamientos, posteriormente se colocaron en la estufa con 5% de CO₂ a 38°C, y con 90% de humedad. Este proceso de maduración tuvo una duración de 24 horas.

Se realizaron varios ensayos previos para la estandarización de la dosis del suplemento. La media de aspiracion de ovocitos viables en estos ensayos fué de 5.02, obtenidos estos datos se

procedió a llevar a cabo un ensayo que constó de 250 ovocitos clasificados como A y B.

Se distribuyeron al azar 50 ovocitos clasificados como A y B en cada uno de los siguientes tratamientos: T-FSH (TCM-199 + 20 microgr./ml. de FSH-LH), T-PER (TCM-199 + .02 UI/ml Pergonal), T-SVE (TCM-199 + 20% SVE), T-SFB (TCM-199 + 20% SFB), T-HCG (TCM-199 + 10 UI/ ml HCG). La aspiración la realizaron 2 ó 3 técnicos entrenados. La clasificación A y B la realizó una sola persona, al igual que la evaluación de la maduración en términos de expansión de células del cúmulus.

El criterio para determinar la maduración fué: Según el porcentaje de expansión de células del cúmulus en Expandidos, Semiexpandidos y No Expandidos.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de " chi cuadrada de contingencia de 2X2 ", donde se evaluaron las diferencias entre tratamientos.

1.- TALP-HEPES. Solución Base.	Cantidad	
Ingredientes	1000	ml
NaCl	6.66	mg
KCl	.2386	mg
NaHCO ₃	.268	mg
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	.0056	mg
Na Lactato	1.86	Microlitros
CaCl ₂ 2H ₂ O	.299	mg
MgCl ₂ -6H ₂ O	.1	mg
Rojo Fenol	.1	mg
Hepes	2.383	mg

2.- Medio de Maduración. Solución base.	Cantidad	
Ingredientes	1000	ml
TCM-199	9.99	gr
NaHCO ₃	2.22	gr
Agua Desionizada	1000	ml

3.- Piruvato. Solución Base.	Cantidad	
Ingredientes	10	ml
Piruvato de Sodio	.0220	gr.
Agua Desionizada	10	ml

Nota: No usarlo más de una semana.

4.- Antibiótico. Solución Base.

Ingredientes	Cantidad
Penicilina y Estreptomina base.	
Penicilina G Sódica	100 ml
Sulfato de Estreptomina	.6017 gr
Agua Desionizada Esterilizada	1 gr
al 0.9% de NaCl.	100 ml

Nota: Se recomienda 100 microlitros/ml.

5.- Sulfato de Gentamicina. Solución Base. Cantidad

Ingredientes	10 ml
Sulfato de Gentamicina	0.100 gr
Agua Desionizada Esterilizada	10 ml

Nota: Adicionar 10 microlitros/ml.

6.- Gonadotropinas. Solución Base. Cantidad

Ingredientes	5 ml
FSH (Contaminada con LH)	50 mg
Agua Desionizada Esterilizada al	
0.9% de NaCl.	5 ml

Hacer alicuotas de 2 microlitros en tubos y congelarlos. Concentraciones de trabajo 20 microgr./ml.

7.- Suero de Vaca en Estro. Solución Base. Cantidad

Suero de Vaca en Estro	500 ml
------------------------	--------

Se inactiva a 56°C por media hora en baño Maria, y se hacen alicuotas de 10, 20 y 50 ml. las cuales se someten al congelador.

8.- Suero Fetal Bovino. Solución Base Cantidad

Suero Fetal Bovino	500 ml
--------------------	--------

Se inactiva a 56°C por media hora en baño Maria, y se hacen alicuotas de 10, 20 y 50 ml. las cuales se almacenan en el congelador.

9.- Gonadotropina Coriónica Humana. Solución Base.

Hormona Gonadotrópica Humana	5000 UI
------------------------------	---------

Agua Desionizada Esterilizada	
-------------------------------	--

con NaCl al 0.9%.	1000 microlitros
-------------------	------------------

Obteniendo una concentración final de 10 UI/ml. = 2 microlitros/ml.

10.- Pergonal. Solución Base.	Cantidad
FSH	75 UI
LH	75 UI
Agua Desionizada Esterilizada al 0.9% de NaCl.	10 ml
Obteniendo una concentración final de .02 UI/ml. = 2.5 microlitros/ml.	

1.- Medio de Maduración base para ovocitos.	Cantidad
Medio de Maduración. Solución Base	8 ml
Suero Fetal Bovino	2 ml
Piruvato. Solución Base.	100 microlitros
Gentamicina. Solución Base.	10 microlitros
Ajustar el pH a 7.10 ya que este llegará a 7.4 al ser filtrado con .22 micras.	

2.- Medio TALP-HEPES.	Cantidad
Talp-Hepes. Solución Base.	500 ml
Suero Albumina Bovina	1.5 gr
Piruvato. Solución Base.	5000 microlitros
Sulfato de Gentamicina. Solución Base.	250 microlitros
Ajustar el pH a 7.4 - 7.5 y filtrar con .22 micras, la osmolaridad se debe encontrar 255-270 mOSM.	

En el cuadro 1 se muestra la eficiencia en la aspiración del CCO de los cinco ensayos realizados previamente al ensayo de maduración de CCO. De 185 ovarios se obtuvieron 953 ovocitos viables (CCO), clasificados como A y B. El promedio de la eficiencia de aspiración fué 5.02 CCO por ovario, siendo los rangos de 4.17 a 6.17 ovocitos viables por ovario.

En el cuadro 2 y gráfica 1 se muestran los porcentajes de expansión de células del cúmulus del ensayo de maduración de ovocitos realizado. Cuando se compararon los resultados de maduración en el ensayo con los cinco tipos de suplementos se observó que los tratamientos con FSH-LH y Pergonal presentaron el mayor ($P > 0.05$) porcentaje de ovocitos expandidos comparados con los demás tratamientos (86, 94 vs 26, 62 y 48 %, los últimos tres SVE, HCG y SFB respectivamente). Por otro lado el tratamiento con HCG y SFB tuvieron valores intermedios (62 y 48 % respectivamente) de expansión que a su vez fueron diferentes ($P > 0.05$) tanto el grupo de FSH-LH y Pergonal como al SVE.

Por el contrario cuando se analizó el porcentaje de ovocitos semiexpandidos, se observó que el grupo SVE mostró mayor ($P < 0.05$) número de ovocitos (74 %) con estas características. Los grupos HCG y SFB mostraron valores intermedios (38 y 52 % respectivamente). Por su parte los grupos FSH-LH y Pergonal mostraron los porcentajes menores ($P > 0.05$) de ovocitos semiexpandidos (14 y 6 %

(Grafica 1).

En ninguno de los tratamientos se observó la clasificación de no expandidos.

Para hacer una evaluación más certera entre la eficiencia de un suplemento con otro se requirió hacer un análisis estadístico por medio de la prueba de χ^2 de contingencia de 2X2 (χ^2 c), relacionando cada uno de estos suplementos con los demás.

Se obtuvo una χ^2 c de 2.78 comparando la FSH-LH con Pergonal, siendo este resultado menor a la χ^2 de tablas ($P > 0.05$); por lo tanto no hubo diferencia significativa. De la comparación entre FSH-LH con SVE se obtuvo una χ^2 c de 32.04, siendo este resultado mayor a la χ^2 de tablas ($P < 0.05$); por lo tanto si hay diferencia significativa. Comparando FSH-LH con HCG se obtuvo una χ^2 c de 6.29, siendo este resultado mayor a la χ^2 de tablas ($P < 0.05$); habiendo diferencia significativa entre estos tratamientos. En la comparación de los tratamientos de FSH-LH con SFB se observó una χ^2 c de 14.43, siendo este valor mayor a la χ^2 de tablas ($P < 0.05$); teniendo estos tratamientos diferencia significativa. El resultado de χ^2 c entre los tratamientos de Pergonal con SVE es de 43.03, valor mayor a la χ^2 de tablas ($P < 0.05$); teniendo diferencia significativa. Comparando el Pergonal con HCG se obtuvo una χ^2 c de 13.11, siendo este resultado mayor a la χ^2 de tablas ($P < 0.05$); observándose diferencia significativa. La χ^2 c entre Pergonal y SFB fué de 23.23, valor mayor a la χ^2 de tablas ($P < 0.05$); obteniendo

diferencia significativa. El resultado de χ^2 entre SVE y HCG fué de 14.01, siendo mayor al valor de χ^2 de tablas ($P < 0.05$); teniendo estos tratamientos diferencia significativa. Los tratamientos de SVE y SFB obtuvieron una χ^2 de 5.94 siendo este valor mayor a la χ^2 de tablas ($P < 0.05$); teniendo diferencia significativa. Los tratamientos de HCG y SFB tuvieron una χ^2 de 1.42, siendo este valor menor a la χ^2 de tablas ($P > 0.05$); observándose que no hay diferencia significativa.

CUADRO No.1

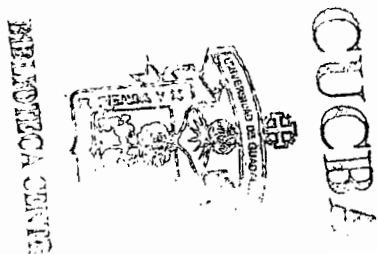
COLECCION Y EFICIENCIA EN LA ASPIRACION DEL COMPLEJO CUMULUS OVOCITO (CCO)

No. DE ENSAYO	No. DE OVARIOS	No. DE CCO VIABLES	EFICIENCIA EN LA ASPIRACION
1	23	96	4.17
2	10	50	5.00
3	40	247	6.17
4	63	340	5.30
5	49	220	4.50
TOTAL	185	953	$\bar{X} = 5.02$

**EFFECTO DEL USO DE DIFERENTES SUPLEMENTOS PARA LA
MADURACION DE OVOCITOS DE ORIGEN BOVINO**
CUADRO No.2

	SUPLEMENTO				
	FSH - LH	PERGONAL	SVE	HCG	SFB
EXPANDIDOS	43 / 50 ^a (86)	47 / 50 ^a (94)	11 / 43 ^b (26)	31 / 50 ^{od} (62)	23 / 48 ^{od} (48)
	SEMIEXPANDIDOS	7 / 50 ^a (14)	03 / 50 ^a (6)	32 / 43 ^b (74)	19 / 50 ^{od} (38)
NO EXPANDIDOS	0 / 50 (0)	0 / 50 (0)	0 / 43 (0)	0 / 50 (0)	0 / 48 (0)

DIFERENTES LITERALES INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P < 0.01)
ENTRE PARENTESIS EL PORCENTAJE



CUADRO No.3

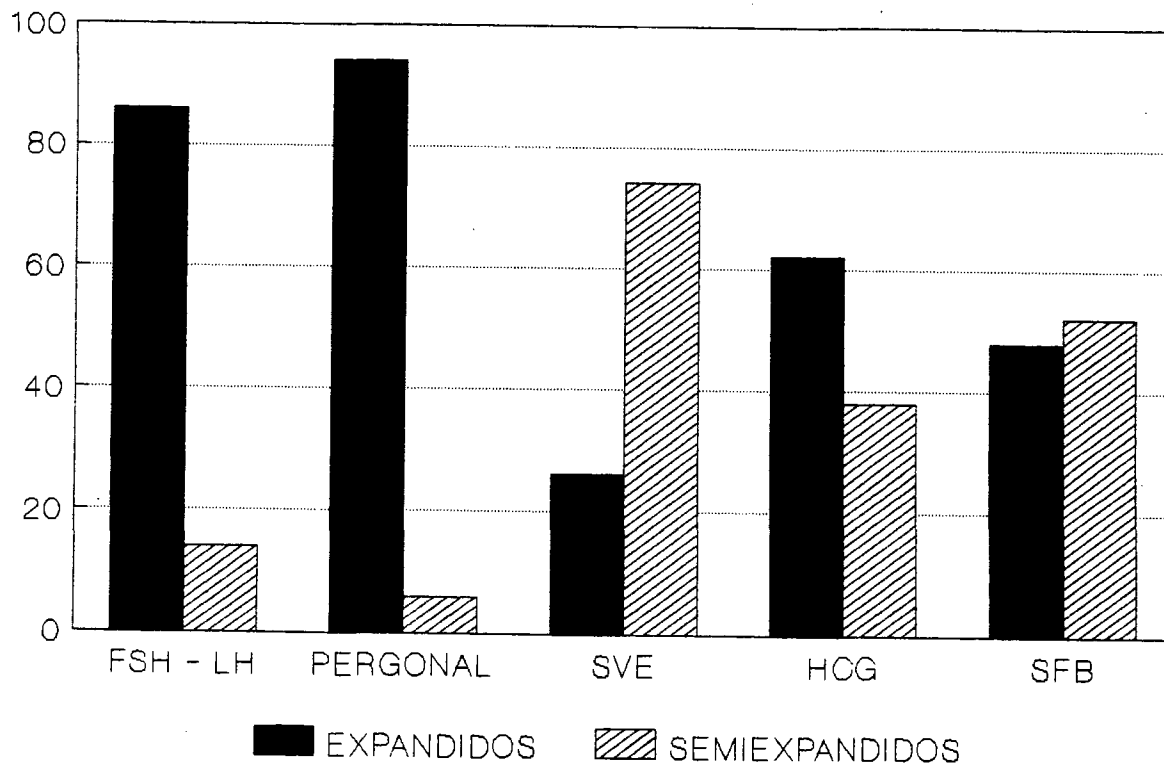
RESULTADOS ESTADISTICOS ENTRE SUPLEMENTOS

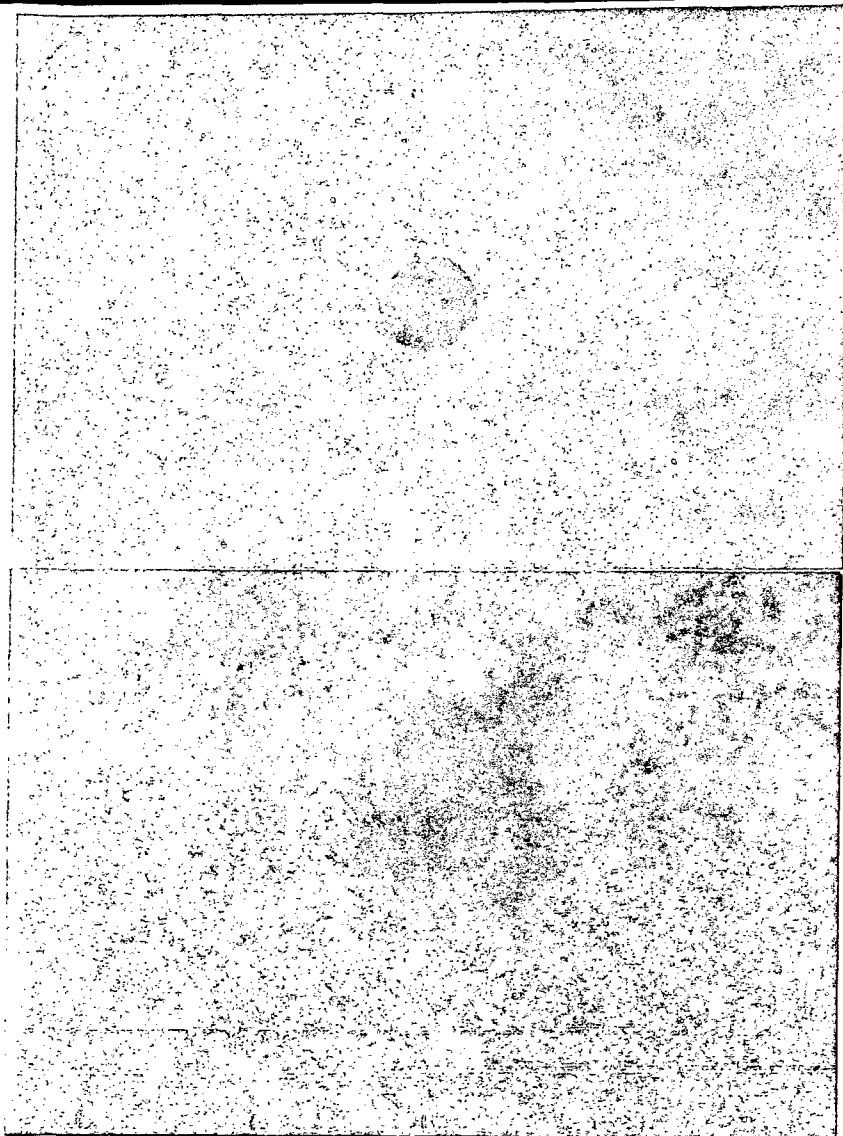
	FSH-LH/PERG	FSH-LH/SVE	FSH-LH/HCG	FSH-LH/SFB	PERG/SVE
PROBABILIDAD (0.05)	>	<	<	<	<
X^2 -	2.78	32.04	6.29	14.43	43.03

	PERG/HCG	PERG/SFB	SVE/HCG	SVE/SFB	HCG/SFB
PROBABILIDAD (0.05)	<	<	<	<	>
X^2 -	13.11	23.23	14.01	5.94	1.42

GRAFICA No.1

PORCENTAJE DE MADURACION DE CADA UNO DE LOS 5 SUPLEMENTOS UTILIZADOS

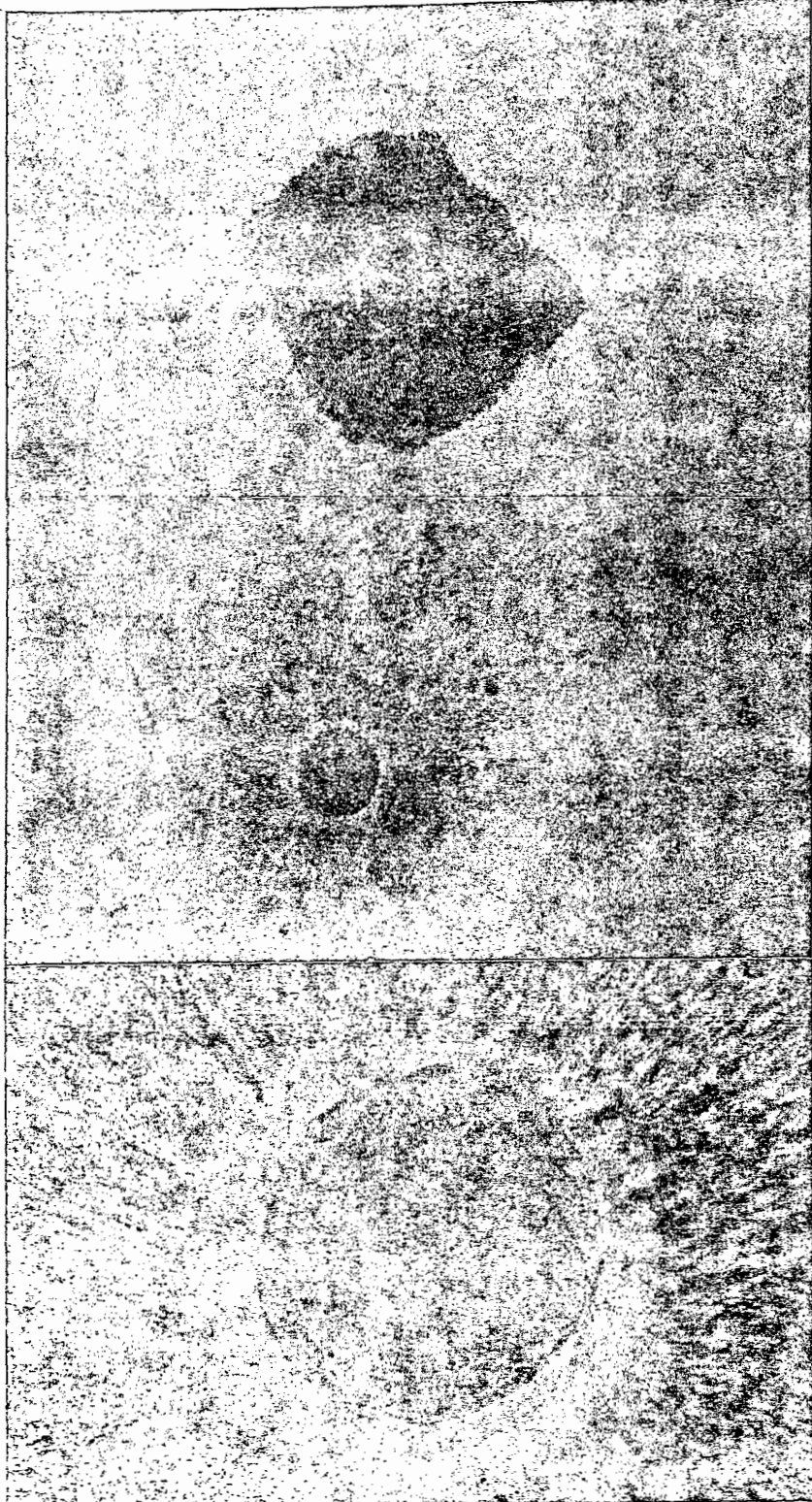




A

B

- A) OVOCITO DESNUDO
- B) OVOCITO EXPANDIDO
- C) OVOCITO COMPACTO
- D) OVOCITO EXPANDIDO
- E) ACERCAMIENTO DE UN OVOCITO EXPANDIDO



C

D

E

De los resultados observados en el cuadro 1 se obtuvo que la media de aspiración de ovocitos viables a madurar (5.02) por ovario fué menor a lo reportado por (26) que obtuvo una media de (5.5) CCO por ovario y por (29) y (14) que fueron de 10 y 9.9 ovocitos por ovario respectivamente. Este bajo promedio en la aspiración probablemente fué debido a fallas en la aspiración y búsqueda de ovocitos a través del microscopio, ya que existen investigaciones por las cuales se podría esperar que en la fecha en que se realizó en trabajo debió de presentarse un mayor potencial gonadal. (7)

Se ha demostrado que el porcentaje de animales con estructuras ováricas en el mes de Septiembre fué de 100%, Junio 93.9% y Julio 95.9%, este reporte fué hecho bajo condiciones de clima tropical húmedo en el rastro Municipal de Chetumal, Q. Roo. (7)

El criterio para la clasificación utilizado en este trabajo para la elección de ovocitos para la maduración in vitro puede compararse con la clasificación hecha por (22) quien los clasifica dentro de tres categorías dependiendo de las apariencias generales de los ovocitos; "buenos" donde ellos están completamente rodeados por una capa densa de células de la granulosa, "regulares" si están rodeados por una capa de células de la granulosa y "pobres" si son anormales o deformes. (22) Considera que los ovocitos de la primera categoría representan aproximadamente el 25% del total de la colección y los comprende como el mejor grupo capaz de madurarse in vitro. (24), (33) y (11) Solamente aislaron y utilizaron ovocitos con densas y compactas células del cúmulus y un ooplasma homogéneo

para la maduración in vitro de ovocitos equinos y bovinos respectivamente. (16) y (36) Consideran que son más aptos para madurarse in vitro ovocitos rodeados por células del cúmulus compactas obteniendo una proporción más alta de desarrollo embrionario.

Por otra parte al analizar los resultados observados en cuanto a dispersión de células del cúmulus de los ovocitos, se coincidió en clasificarlos en: expandidos, semiexpandidos y no expandidos, en la clasificación hecha por (4) por su grado de maduración in vivo: en donde la equivalencia es la siguiente: Maduros igual a Expandidos, Intermedios igual a Semiexpandidos, Inmaduros igual a no Expandidos y Atrésicos igual a ovocitos no aptos para la maduración in vitro.

Los criterios para evaluar la maduración son muy diversos. Son pocos los que evalúan la maduración en base a la expansión de las células del cúmulus como lo son (37), (4) y (33). Sin embargo otros utilizan el porcentaje de penetrabilidad del espermatozoide al óvulo (19), cambios de la meiosis (4) y (28).

Pueden ser comparables los resultados de los ovocitos expandidos del presente trabajo con los ovocitos penetrables de algunos autores, ya que se puede considerar como más fácilmente penetrable los ovocitos expandidos por la relación que guardan en la distancia una de otra células del cúmulus al expandirse en vitro.

El proceso de la reacción acrosomal permite o facilita la transposición del espermatozoide capacitado a través de las investmentas del ovocito para fertilizarlo, algunas de las enzimas

del acrosoma que penetran las investmentas son: hialuronidasa, que dispersa las células del cúmulus; estearasas, que ayuda a la penetración de la corona radiada; acrosina, ayuda a la disolución de la zona pelúcida, y otras como las fosfatasas acidas, fosfolipasas A, etc. que ayudan a la fusión membranal de los gametos. (38)

Los resultados de este trabajo en cuanto a los ovocitos expandidos utilizando el medio TCM-199 con el suplemento de SFB que fué de 48%, comparado con (36) y (28) que obtuvieron 62.9 y 62.8% expandidos y logrados a metafase II respectivamente, utilizando el mismo suplemento; y (20) obtuvo un 73% de penetrabilidad también utilizando SFB pero adicionando FSH; se observa que son mayores estos resultados y esto pudo ser debido a varios factores como son la baja calidad de sueros por guardarlos por largo tiempo ya que no se contaba con una fuente de obtención segura, o por posibles contaminaciones y fallas en el equipo.

El resultado de 26% en la expansión de ovocitos con el suplemento de SVE también se observa bajo comparándolo con los resultados de (19) y (28) que fueron de 31% y 56% penetrados y logrados a metafase II respectivamente, esta baja en la maduración también pudo deberse por los factores antes mencionados.

Los resultados obtenidos con los suplementos FSH-LH y Pergonal en este trabajo fué de 86 y 94% respectivamente de ovocitos expandidos comparado con (20) que obtuvo un 73% de penetrabilidad adicionado además con SFB, y con (34) que obtuvo un 30% de ovocitos en Metafase II, y con (27) que obtuvo un 76% de penetrabilidad; utilizando todos ellos FSH; aquí se observa que son más altos los

porcentajes en este trabajo, esto pudo ser debido a que se usaron dosis adecuadas en los tratamientos. Se cree que la utilización de Pergonal en uno de los suplementos dió casi los mismos resultados que la FSH-Schering ya que este contiene también gonadotropinas necesarias para una maduración óptima.

Normalmente en el organismo de una hembra el crecimiento folicular es estimulado a partir de las gonadotropinas FSH y LH; el desarrollo final depende solamente de la elevación de la LH.

(35).

1.- Tanto el Pergonal como la FSH son suplementos efectivos en la maduración de ovocitos in vitro de bovinos, sin embargo el Pergonal tiene la ventaja de tener disponibilidad en México y no así como la FSH (Schering) de origen extranjero.

2.- La eficiencia de los cinco suplementos utilizados en el medio TCM-199 son: en primer lugar FSH-LH y Pergonal, en segundo lugar SFB y HCG; y por último SVE, que se expresa por el grado de expansión de las células del cúmulus.

3.- El mayor desarrollo de las células del cúmulus se muestra en los tratamientos de FSH-LH y Pergonal, entre los que no hubo una diferencia estadística significativa.

4.- Aunque es evidente la ventaja de contar en nuestro país con los requerimientos para esta técnica, hacen falta estudios desde el punto de vista económico para evaluar el impacto del ahorro económico con el uso de esta hormona (Pergonal) en todo el sistema de producción lineal de embriones in vitro.

- 1.- ALBERTS, B.: Molecular Biology of the Cell. Edit. Garland Publishing, Inc. Second Edition. New York, USA. 1989. pp 855, 857, 858.
- 2.- ASPRON, P.M.A.: Evolución Histórica de la Transferencia de Embriones. Revista Cebú. 1989. pág. 47.
- 3.- AUSTIN, C.R., SHORT R. V.: Control Artificial de la Reproducción. Ediciones Copilco S.A. México, D.F. 1982. pág. 93.
- 4.- BAR, A. S.: Different morphological and steroidogenic patterns in oocyte/cumulus-corona cell complexes aspirated at in vitro Fertilization. Biol. of Reprod. 41: 761-770. 1989.
- 5.- BALINSKY, B.I.: Introducción a la Embriología. Primera edición. Ediciones Omega. Barcelona, 1978. pág. 7.
- 6.- BANKS, W.J.: Histología Veterinaria Aplicada. Primera Edición. Manual Moderno. México, D.F., 1986. pág. 629.
- 7.- CELIS, G. I. P., RODRIGUEZ R. O. L.: Estudios reproductivos a nivel de rastro. II. Estacionalidad del ganado

cebú de acuerdo a la condición ovárica. Reunión de Investigación pecuaria en México 1985. Memoria. pág. 196

- 8.- ENTRALGO, P. L.: Historia de la Medicina. Primera Edición. Editorial Salvat. España, 1978. pág. 267.
- 9.- EPEL, D.: The program of fertilization. Scientific American. Investigación y Ciencia Noviembre 1978. pp 63 - 69
- 10.- EPPIG, J. J.: Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complexes in vitro. Biol. of Reprod. 22; 629-633.
- 11.- FAYRER, H. R.; DVM, PhD, MRCUS, and A. B. CAUDLE DVM.: Bovine in vitro Fertilization: Will the Techique be practical? Embryo Transfer. 5; 1-5. 1990.
- 12.- FIRST, N.L.: New animal breeding techniques and their application. I. Reprod. Fert. 41; 3-14. 1990.
- 13.- FRANDSON, R.D.: Anatomía y Fisiología de los animales domésticos. Tercera Edición. Editorial Interamericana. México, D.F., 1986. pág. 385.

- 14.- FUNAHASHI, H.: Developmental capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized in vitro. Theriogenology. 36; 427-436. 1991.
- 15.- GRAU, H. y WALTER P.: Histología y Anatomía Microscópica comparada de los Mamíferos Domésticos. Primera Edición. Editorial Labor S.A. Barcelona, 1975. pág. 140.
- 16.- GREVE, T.V. M.: In vitro fertilization in cattle: areview Reprod. Nutr. Dev. 31; 147-157. 1991.
- 17.- HAFEZ, E.S.E.: Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Quinta Edición. Editorial Interamericana México, D.F. 1990. pp 41, 147.
- 18.- INEGI, Perfil Sociodemográfico. XI Censo General de Población y Vivienda, Inegi. 1990.
- 19.- KIM, C.I., I.E. ELLINGTON and R.H. FOOTE: Maturation, Fertilization, and development of bovine oocytes in vitro using TCM-199 and a simple defined medium with co-culture. Theriogenology. 33; 433-440. 1990.

- 20.- LEIBFRIED, R. M.L., E.S. CRISTER, W.H. EYESTONE., D.L. NORTHEY, and N.L. FIRST.: Development potencial of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. Biol. of Reprod. 36; 376-383. 1987.
- 21.- Mc. DONALD, L.E.: Veterinaria: Reproducción y Endocrinología 1. Segunda Edición. Editorial Interamericana. México, D.F., 1991. pág. 2
- 22.- Mc. GAUGHEY, R.W.: In vitro oocyte maturation. This chapter was supported in part by Research Grant NIH-HD and by Arizona State University. pp 1-19.
- 23.- MOORE, K.L.: Embriología Clínica. Segunda Edición. Editorial Interamericana. México, D.F., 1979. pág. 9.
- 24.- OLSON, S.E.: Effects of gonadotropins during in vitro maturation of bovine oocytes of subsequent embryonic development. Theriogenology. 35; 250. 1991.
- 25.- PATTEN, M. Embriología Humana. Primera Edición. Editorial El Ateneo. Argentina, 1979. pág. 2.
- 26.- ROA, V. J.J.: Estandarización de la Técnica de Fertilización in vitro en bovinos. Tesis Profesional. FMVZ de la U. de G. 1992. pp 21-32, 41.

- 27.- SAEKI, K.M., HOSHI, M.L. LEIBFRIED.-RUTLEDGE and N.L. FIRST:
In vitro fertilization and development of bovine
oocytes matured with commercially available follicle
stimulating hormone. Theriogenology. 34; 1035-1039.
1990.
- 28.- SANBUISSHO and W.R. THRELFALL.: The influence of serum and
gonadotropins on in vitro maturation and fertilization
of bovine oocytes. Theriogenology. 34; 341-349. 1990.
- 29.- SHIMOHIRA, I.: Manual of embryo transfer and in vitro
fertilization technology for cattle. 1991. pp
43,44,45.
- 30.- SISSON, S. y GROSSMAN. J.D.: Anatomía de los animales
domésticos. Quinta Edición. Editorial Salvat.
México, D.F., 1990. pp 182, 183, 1049, 1051.
- 31.- SMIDT, D.: Endocrinología y Fisiología de la Reproducción de
los animales zootécnicos. Primera Edición. Editorial
Acribia. Zaragoza, España, 1972. pág. 40.
- 32.- SORENSEN, A.M.: Reproducción Animal. Primera Edición.
Editorial Mc. Graw Hill Book Co. USA. México, D.F.
1979. pp 194, 196.

- 33.- WILLIS, P.: Efecto of serum on in vitro maturation of equine oocytes. Theriogenology. Vol. 33. No. 1 pág. 345. 1990.
- 34.- WILLIS, P.: Efects of time and hormones on in vitro maturation of equine oocytes. Theriogenology. Vol. 35. No. 1 pág. 294. 1991.
- 35.- WILSON, J.A.: Fundamentos de Fisiología Animal. Primera Edición. Editorial Limusa. México, D.F., 1989. pág. 551
- 36.- YOUNIS, A.I., B.G. BRACKETT and R.A. FAYRER H.: Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization in vitro. Gamete Research. 23; 189-201. 1989.
- 37.- YOUNIS, A. I. and B. G. BRACKETT.: Importance of cumulus cells and insemination intervals for development of bovine oocytes into morulae and blastocysts in vitro. Theriogenology. 36; 11-21. 1991.
- 38.- ZUCKERMANN, A.F.A.: Capacitación y Fertilización "in vitro" de gametos de bovino. Tesis Profesional. FMVZ de la UNAM. México, D. F. 1980. pág. 12.