

Evaluación de la fertilidad *in vitro* del semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados

Próspero Cabrera V.¹, Washington Yoong K.²

Resumen

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE), convenio Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) - Ministerio de Agricultura (MINAG); ubicada en el campus de la UNALM. El objetivo fue evaluar la fertilidad y la producción de embriones *in vitro* de cuatro toros provenientes del Banco Nacional de Semen: Pepe, Miguel, Juanjo y Vito. Para este estudio se utilizaron 1031 ovocitos de calidad A y B aspirados de ovarios de vacas beneficiadas en camal. Los ovocitos fueron madurados en medio TCM-199. Para la separación espermática se usó el método de centrifugación con gradientes de Percoll, la capacitación y fertilización se realizó en el medio TALP-IVF + PHE y el cultivo de embriones con medio Sofaa + 5% de Suero Fetal Bovino (SFB). Los embriones fueron evaluados los días 7, 8 y 9 después de la fertilización. De los resultados obtenidos no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los cuatro toros evaluados ($P > 0.05$), siendo el porcentaje de fertilización de 68.8%, 72.8%, 63.3% y 56.7% para Juanjo, Vito, Pepe y Miguel, respectivamente. Respecto a la producción de embriones tampoco encontramos diferencias estadísticas significativas entre los toros ($P > 0.05$) obteniéndose para el caso de Juanjo 32.2%, Vito 29.3%, Pepe 20.3% y Miguel 20%. De estos resultados se puede concluir que los toros evaluados se encuentran en el rango normal de producción de embriones *in vitro*, de 20% a 40% reportado por Palma y col (2001).

Palabras clave: *Ovocitos, Embriones, Blastocistos, Percoll.*

Abstract

This study was carried out in the Center of Research and Instruction in Embryo Transfer (CIETE), sponsored by a partnership between the National Agrarian University of La Molina (UNALM) and the Ministry of Agriculture (MINAG), located on the UNALM campus. The objective was to evaluate the fertility and *in vitro* production of embryos of four bulls from the National Semen Bank: Pepe, Miguel, Juanjo and Vito. This study used 1031 oocytes of quality A and B suctioned from the ovaries of slaughtered cows. The oocytes were matured in the TCM-199 medium; for spermatic separation the Percoll gradient centrifuge method was used; the preparation and fertilization was done in the TALP-IVF + PHE medium and the embryos culture with the Sofaa medium with 5% Fetal Bovine Serum (FBS). The embryos were evaluated 7, 8 and 9 days after fertilization. There were no statistically significant differences among the four bulls evaluated ($P > 0.05$), the fertilization rate being 68.8%, 72.8%, 63.3% and 56.7% for Juanjo, Vito, Pepe and Miguel, respectively. With respect to the production of embryos, there also were no statistically significant differences among the bulls ($P > 0.05$); the results were: Juanjo 32.2%, Vito 29.3%, Pepe 20.3% and Miguel 20%. From these results it can be concluded that the bulls tested were in the normal range for *in vitro* embryo production, from 20% to 40% as reported by Palma and Col (2001).

Key words: *Oocytes, Embryos, Blastocysts, Percoll.*

1. Introducción

Las biotecnologías reproductivas son una herramienta de mucho beneficio para los productores pecuarios, estas han sido desarrolladas con miras a optimizar los sistemas de producción. La Fertilización *in Vitro* (FIV), ofrece nuevas dimensiones en la reproducción animal, es una herramienta valiosa para la investigación en combinación con la transferencia de embriones.

Muchas investigaciones han buscado probar la fertilidad *in Vitro* de Toros y a la vez validar protocolos de FIV, elementos importantes, principalmente para el desarrollo de esta biotecnología y de la ganadería en el país, ya que al obtener resultados satisfactorios en producción de embriones se podrán ofrecer nuevas alternativas reproductivas para los establos.

Se han planteado los siguientes objetivos:

- Evaluar la fertilidad *in Vitro* de los toros jóvenes

del Banco Nacional de Semen, con ovocitos provenientes de ovarios de camal.

- Determinar el porcentaje de fertilización en ovocitos madurados *in Vitro* obtenidos de ovarios de camal.
- Determinar el porcentaje de embriones viables y porcentaje de desarrollo embrionario al día 7,8 y 9 de la fertilización *in Vitro*.

1.1 Producción de embriones *in Vitro*

La técnica de FIV consiste, básicamente, en la exposición de ovocitos maduros a espermatozoides capacitados, de tal manera que se produzca la fecundación, fuera del oviducto materno. El mayor éxito del procedimiento de FIV se demuestra al producir individuos vivos procedentes de esta técnica, utilizando tanto ovocitos madurados *in vivo* o madurados *in vitro*, aunque la eficiencia de estos procesos de IVF disminuye respecto a la fecundación natural, de igual modo que cuando se utilizan ovocitos madurados *in vivo* frente a los madurados *in Vitro*, (Lorenzo y col., 1994).

¹ Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina.
E-mail: procecavi@lamolina.edu.pe

² Master Sci. in Animal Production

1.2 Clasificación de ovocitos según su morfología

Las células del cúmulus son subpoblaciones de células de la granulosa las cuales proveen de nutrientes al ovocito durante el 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 (Arlotto y col.1996).

Cada laboratorio establece un tipo de clasificación para los ovocitos recuperados que se van a someter a procedimientos *in vitro*. Los ovocitos pueden ser clasificados de acuerdo al número de capas de células del cúmulus y la apariencia del citoplasma. De estas categorías en general se considera que solamente los ovocitos tipo A y B poseen un elevado potencial para desarrollarse a embriones por FIV (Ramírez y Jiménez, 1993).

1.3 Factores que influyen en la fertilización *in Vitro*

Salgado y col. (2005) evaluaron tres dosis de espermatozoides del eyaculado de un toro de raza Holstein: 0.5×10^6 ; 1×10^6 y 2×10^6 espermatozoides/ml). Luego de 18 horas post-fertilización los ovocitos fueron fijados en una solución 1:3 de ácido acético y metanol respectivamente, durante 24 horas. Fueron teñidos con una solución de orceína al 2% para evaluar la fertilización. El mayor porcentaje de ovocitos penetrados, 67% se presentó cuando el medio de fertilización fue suplementado con una concentración 10 mg/ml de heparina ($p < 0.05$). La mayor proporción de ovocitos fertilizados (68%), con la menor presentación de poliespermia, (12%), se obtuvo con dosis seminales de 1×10^6 espermatozoides.

1.4 Efecto del semen en la fertilización *in vitro*.

Bastidas y col (1999) estudiaron el potencial fertilizante en Bos Taurus, Bos Indicus y Búfalos. Encontraron diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la tasa de fertilización de los ovocitos de vaca (68%) comparada con los ovocitos de búfala (47 %), no encontrándose diferencias significativas entre la capacidad fertilizante de los diferentes tipos de semen ($P > 0.05$); demostrando la factibilidad de la implementación de la técnica de FIV heteróloga, donde existe una fuente económica de ovocitos bovinos a nivel de camal, permitiendo incorporar un método de predicción del potencial fertilizante de semen de reproductores de diferentes especies a nivel de laboratorio.

1.5 Tasa de producción de blastocistos bovinos

Palma y col. (2001) aseguran que los resultados a través de la última década indican que 20 a 40% de los ovocitos seleccionados para maduración *in Vitro* alcanzan el estadio de blastocisto. Existe una amplia variabilidad en la tasa de desarrollo de 40 toros provenientes de Centros de Inseminación Artificial, la tasa de mórulas y blastocistos varió entre 10% y 51 %. En un estudio similar con 60 toros frente a un toro control observaron variaciones amplias. De un total de 3338 ovocitos se observó un promedio de 29.2%

de blastocistos al día 7, con una variación de 10% a 57%. La tasa de desarrollo de blastocistos obtenidos con el semen del toro control variaron entre 4% y 57% (27.9% promedio). El promedio de los toros no fue diferente al del toro control.

Olivera (2003) recomienda la utilización de la Fertilización *in Vitro* para la producción de animales F1, en lugares con climas adversos, asegura que en promedio se produce un embrión de excelente calidad cada 25 ovocitos recuperados. Se transfirió tres embriones producidos *in Vitro*, con ovocitos recuperados de ovarios de camal de vacas Holstein y semen de toro blanco oreja negra, uno de los cuales condujo al nacimiento de un F1.

Alberio, (2003), describe un trabajo realizado por Ludica y col, (1998), al evaluar la producción de: embriones *in Vitro*, en sus primeras sesiones obtuvieron un porcentaje e de 14 % de embriones transferibles, por inconvenientes como cortes de luz y contaminaciones, pero el final del estudio y con mejoras en la técnica obtuvieron una tasa de producción de embriones mayor al 25 %, lo cual concuerda con la tasa de producción de embriones obtenidos en el presente trabajo, en el cual se llego a obtener un porcentaje mayor al 25 %, por corrida o sesión.

Galli y col, (2003), describe una tasa de producción de blastocistos de 21.8% en vacas y 15.6% en vaquillas, el cual se encuentra un poco mas bajo que los resultados obtenidos en este trabajo, 25.12% de blastocistos totales producidos, con una variación de 20 a 3226%, pero sin embargo se encuentran en el mismo rango.

2. Materiales y métodos

2.1 Lugar de trabajo

La investigación se desarrolló en el Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE), convenio de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) -Ministerio de Agricultura (MINAG). Ubicado en Lima. Perú.

2.2 Material biológico

Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios de animales beneficiados en el camal de Yerbateros.

1.1 Medios utilizados

- Medio de Aspiración (MDPBS).
- Medio de Maduración (TCM-199).
- Percoll (capacitación espermática).
- Medio de Fertilización (TALP-IVF + PHE).
- Medio de cultivo (SOFaa + 5% de PCS).

2.3 Proceso de producción de embriones *in Vitro*

2.3.1 Día - 1, en laboratorio

Previo a la llegada de los ovarios, se colocó en baño de María a 35 grados centígrados, solución fisiológica mas 5 ml de Estreptomicina. Al mismo tiempo se prepararon los materiales y equipos necesarios para la aspiración de los ovocitos. Se utilizó medio .MDPBS, para la aspiración de los ovocitos y medio de maduración (IVM), para los ovocitos.

En el camal, en un termo de boca ancha se colocó suero fisiológico mas la Estreptomicina para

transportar los ovarios del camal al laboratorio, los ovarios fueron colectados directamente del animal sacrificado.

Además, para la aspiración de los ovocitos, se utilizó papel toalla estéril y guantes quirúrgicos estériles, mascarillas, gorros, a fin de asegurar la asepsia, una jeringa de 5 ml y aguja 20. Una vez aspirados se colocó en una placa petri de 100 mm para, la búsqueda de los ovocitos.

Los ovocitos fueron ubicados en el estereoscopio a 20x se los clasificó en clase A., clase B, clase C y clase D, según el número de capas de células de cúmulos que cubran al ovocito (Ramírez et al. 1993), estos datos son registrados en las hojas correspondientes. Solo se tomaron en cuenta los ovocitos de calidad A y B.

Una vez que los ovocitos han sido clasificados fueron llevados a la cabina de flujo laminar, donde fueron colocados en gotas de 200 ul con medio de maduración en placas de 60 mm, cubiertas con 8 ml de aceite mineral y finalmente se colocaron las placas en el incubador de CO₂, a 38,5 grados centígrados y 5% de CO₂, por 22 a 24 horas.

2.3.2 Día 0. IVF tratamiento de ovocitos

Se transfirieron los ovocitos madurados del medio de maduración *in vitro* (IVM) al medio de fertilización *in Vitro* (IVF). El medio utilizado para la fertilización *in Vitro* fue el Talp IVF Se retiraron las placas petri de IVM del incubador de CO₂ con los ovocitos madurados, fueron lavados con el medio de fertilización y luego colocados en las placas de IVF, finalmente se guardaron en el incubador de CO₂ hasta que sea el momento de la inseminación.

2.3.3 Tratamiento del semen

Se utilizó el semen de cuatro toros jóvenes del Banco Nacional de Semen. Se realizaron tres repeticiones por toro. En total fueron 12 repeticiones.

Para la capacitación espermática se utilizó el método de gradientes de Percoll. Se prepararon las gradientes usando Percoll al 90% y 45%. La descongelación del semen se realizó en agua a 35 grados centígrados por 30 segundos. Se añadió lentamente en la gradiente de Percoll y se centrifugó a 4000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 200 ul de Talp-IVF, luego se tomó una muestra del tubo que contiene el semen capacitado, se evaluó la motilidad post capacitación espermática, así mismo se tomó otra muestra del mismo tubo y fue colocada en un tubo en 95 ul de agua, homogenizada y se sacó la muestra para colocarlos en la cámara de Neubauer y hacer el conteo de las células espermáticas, posteriormente se colocó el semen en el incubador a 38°C hasta el momento de la inseminación. Una vez que se han contado las células espermáticas en la cámara de Neubauer se calculó la dosis de inseminación y se inseminó con una concentración de 1 millón de espermatozoides/ml.

2.3.4 Día 1- SOFaa

Para el cambio de medio se utilizó el medio de cultivo temprano (SOFaa), más 5% de Suero Fetal Bovino (SFB). Se prepararon las placas petri de SOFaa. Para el cambio de SOFaa se trabajó en la cabina de flujo laminar, se retiraron las placas de IVF

del incubador de CO₂, los ovocitos fertilizados fueron lavados con medio SOFaa y parcialmente denudados y se colocaron en las placas de SOFaa para el cultivo temprano, y se colocó nuevamente al incubador de CO₂.

2.3.5 Día 3, segundo cambio de SOFaa

Para el segundo cambio de medio SOFaa se preparó un tubo de SOFaa con 5% de SFB y fué colocado en el incubador de CO₂ por 2 horas. El cambio consistió en renovar la gota de SOFaa, retirando 75 ul de Sofaa dos veces y agregando medio nuevo, igualmente 75 ul dos veces. La placa de SOFaa se lleva al incubador de CO₂.

2.3.6 Día 6. Tercer cambio de SOFaa

El tercer cambio de SOFaa se realizó exactamente igual que el procedimiento del día 3, con la diferencia que en este cambio de SOFaa, se hizo evaluación de los embriones y se anotaron las divisiones embrionarias y estadios de los embriones. Esto sirvió para determinar los embriones que llegaron a desarrollar hasta el día 7.

2.3.7 Día 7. Evaluación

Se retiraron las placas de SOFaa del incubador de CO₂, y de los embriones evaluados, solo se tomaron en cuenta los que se encontraban en estadio de mórula compacta, blastocisto temprano, blastocisto y blastocisto expandido. Los resultados fueron agregados a la hoja de registro. En este caso se evaluó el día 8 y 9 para ver los embriones que desarrollaron un día después.

2.4 Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos fueron: porcentaje de fertilidad de los toros, y el porcentaje de blastocistos viables al día 7,8 y 9 post inseminación.

2.5 Análisis estadístico

Las variables de respuesta fueron: porcentaje de fertilidad *in vitro*, porcentaje de blastocistos al día 7, 8 y 9 de la fertilización, encontrados en un total de 12 repeticiones *in Vitro*. Para el análisis se utilizó el programa SAS (Statistical Análisis Sistem) utilizando el Diseño Completamente al Azar (DCA) donde los tratamientos fueron el semen de cuatro toros jóvenes del Banco Nacional de Semen.

También se usó las pruebas de significancia DUNCAN y comparación de medias usando el comando LSMEANS.

3. Resultados y discusión

3.1 Porcentaje de fertilización de ovocitos madurados *in Vitro* obtenidos de ovarios de camal.

Los porcentajes de fertilidad *in Vitro* obtenidos por toro se muestran en el Cuadro 1. Según los resultados obtenidos encontramos que el porcentaje de fertilidad mas alto es de Vito con un (72.88 %), seguido por Juanjo (68.82 %) y mas bajo aún, de Pepe y Miguel (56.79 %) (63.33 %) respectivamente. El análisis estadístico de los resultados de fertilidad *in Vitro* ha mostrado que no existen diferencias significativas entre toros (P>0.05).

Tabla 1. Porcentajes de fertilización *in vitro*, en relación con los Ovocitos fertilizados totales por toro.

Toros	Pepe	Miguel	Juanjo	Vito
N° Ovocitos	270	280	186	295
N° Ovo. Fert.	171	159	128	215
N° Blastocisto	55	56	60	88
% Fert.	63.33(a)	56.79(a)	68.82(a)	72.88(a)
% Blastocistos/Ovo.totales	20.37	20(a)	32.26(a)	29.83(a)
% BI/Ovo. Fert	33.16(a)	35.22(a)	46.88(a)	40.93(a)

Figura 1. Porcentajes de fertilidad *in vitro*, Blastocistos en relación con el total de ovocitos y Blastocistos en relación con el total de ovocitos fertilizados.

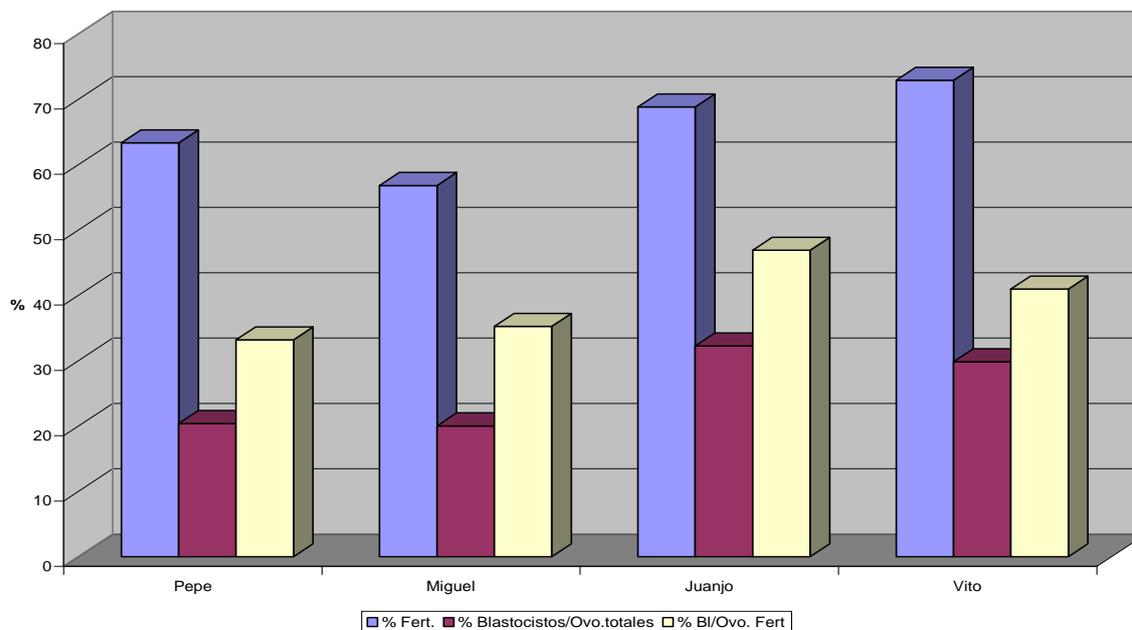


Tabla 2. Porcentaje de fertilización, Blastocistos y Blastocistos/Ovocitos fertilizados.

Toros	Pepe	Miguel	Juanjo	Vito
N° Ovocitos	270	280	186	295
N° Ovo. Fert.	171	159	128	215
N° Blastocisto	55	56	60	88
% Fert.	63.33(a)	56.79(a)	68.82(a)	72.88(a)
% Blastocistos/Ovo.totales	20.37	20(a)	32.26(a)	29.83(a)
% BI/Ovo. Fert	33.16(a)	35.22(a)	46.88(a)	40.93(a)

El porcentaje de fertilidad obtenido, está en un rango de 56:79 % a 72.88 %, coincide con el de la investigación realizada por Bastidas y col, (1999). Sus resultados obtuvieron un porcentaje de 62.5%, 75% Y 65% respectivamente.

Coincide con el trabajo realizado por Salgado y col, (2005), quienes encontraron que la mayor proporción de ovocitos fertilizados fue de 68% (n=55), aunque con menor presentación de polispermia, (12%) y utilizando una dosis de un millón de espermatozoides.

La tasa de fertilización igualmente coincide (56.79% - 72.88%) con Galli y col, (2003), que determinaron un porcentaje de fertilización de 68.6% en vacas y 62.7% en vaquillas.

3.2 Porcentajes de blastocistos obtenidos por toro al día 7, 8 Y 9 de la fertilización *in vitro*

Como se puede observar en el Cuadro 1, los toros que tienen mayor porcentaje de producción de

blastocistos son Juanjo con 32.26% y Vito con 29.83%, mientras Pepe y Miguel siguen con un porcentaje de 20.37% y 20% respectivamente. En el análisis estadístico de los resultados de porcentajes de Blastocistos producidos no se encontraron diferencias significativas entre los toros ($P > 0.05$)

Los resultados de la producción de Blastocistos obtenidos al día 7, 8 Y 9 post inseminación coinciden con los resultados obtenidos por Madrid, (2003) quien evaluó toros de diferentes tasas de No Retorno (alta, media y baja) y no encontró diferencias entre los toros en la producción de blastocistos y en el desarrollo de los embriones a los 7, 8 Y 9 días post inseminación. Si embargo los porcentajes de fertilidad y producción de blastocistos que obtuvo son mayores que los obtenidos en el presente trabajo (91 vs 85% y 90 vs 84,8% respectivamente).

La tasa de desarrollo de blastocistos *in vitro* teniendo en cuenta el total de los ovocitos madurados y

ovocitos fertilizados, son semejantes a los resultados encontrados por Palma y col, (2001), quienes indican que en la última década, de un 20 a 40% de los ovocitos seleccionados para maduración *in vitro* alcanzan estadios de blastocistos. El porcentaje de blastocistos obtenido por toro tienen una amplia variabilidad, Vito de 27.59 a 33.33%, Juanjo de 23.73 a 36.92%, Miguel de 5.26 a 36.36% y Pepe desde 15 a 25.66%. Estos resultados también fueron obtenidos por Palma y col, (2001), con una variabilidad de 10 a 51% y en un segundo estudio sobre un total de 338 ovocitos observaron un promedio de 29.2 % con una variabilidad de 10 a 57% y la tasa de desarrollo del toro control fue de 27.9% con una variabilidad de 4 a 57%. Esta investigación así como las realizadas por Palma y col, no encontraron diferencias entre los toros evaluados a pesar de la variabilidad en el porcentaje de producción de embriones.

3.2.1 Porcentaje de blastocistos según el número de ovocitos fertilizados

En el Cuadro 1, se muestra el porcentaje y el número de Blastocistos obtenidos en relación con los ovocitos fertilizados.

Muestran la misma tendencia que los obtenidos de porcentaje de blastocistos en relación con el total de ovocitos madurados y el porcentaje de fertilización. Siendo Juanjo y Vito los que tienen mayor porcentaje con 46.88% y 40.93% respectivamente, Miguel y Pepe siguen teniendo los porcentajes menores con 35.22% y 32.16% respectivamente.

Los Toros evaluados son aproximadamente de año y medio de edad, y esto podría haber influido en las respuestas de fertilidad, producción de Blastocistos y producción de blastocistos en relación con los ovocitos fertilizados. La evaluación, en el futuro podrían ser mas altos ya que los toros adultos son mas fértiles que los jóvenes tal como lo asegura Decuadro y Himsen, (2000). La fertilidad de un toro de 1 año puede aumentar cuando cumple 2 años, ya que se han observado 4,6 puntos más en el porcentaje de preñez.

Los resultados obtenidos están en el mismo rango de fertilidad con el de Ratto, (2007) el cual obtuvo un porcentaje de fertilización de 76.9%. Sin embargo obtuvimos un mayor porcentaje de producción de blastocistos, 15.7% comparado con un 25.12% obtenido en esta investigación. **Porcentajes de motilidad post descongelación y post-capacitación con Percoll**

El toro Miguel es el que tiene mayor porcentaje de motilidad con 65%, y Pepe con 55%, mientras que los toros que obtuvieron menores porcentajes de motilidad son Juanjo y Vito con 53.33%. Estos resultados de motilidad no concuerdan con los resultados de fertilidad *in Vitro*, en los cuales los toros con mayores porcentajes de fertilidad y producción de embriones son Vito y Juanjo. Esto es debido posiblemente a que en el método de centrifugación por gradientes de Percoll se separan los espermatozoides más débiles y los muertos y solo quedan en el Pellet los más aptos para la inseminación.

El porcentaje mas bajo es de el toro Pepe con 57%, Miguel, Juanjo y Vito tiene los porcentajes mas altos con 73.33, 66.67 y 61.67 respectivamente. Estos resultados concuerdan con los resultados de fertilización y producción de embriones ya que los porcentajes mas altos pertenecen a Juanjo y Vito, con excepción de Miguel que es el que tiene mayor porcentaje de motilidad post capacitación con Percoll sin embargo es el toro que menor fertilidad *in vitro* con 56.79% y también menor porcentaje de producción de blastocistos con 20%. Estos resultados nos indican que después de la capacitación espermática, la fertilidad depende de la capacidad de cada toro para fertilizar y producir embriones, más que la motilidad.

Palma y col (2001), indican que uno de los objetivos de la capacitación espermática es el de obtener espermatozoides con un mínimo de 70% de motilidad, en la presente investigación si bien es cierto que se ha utilizado la técnica de capacitación con Percoll, no existe un Standard dentro de la técnica, los resultados más bajos de motilidad han sido consecuencia del menor tiempo de centrifugación, 5 minutos, en comparación con la metodología descrita por Palma y col (2001) que realizan 2 centrifugaciones, la primera de 20 minutos y la segunda de 5 minutos mas.

4. Conclusiones

1. Los toros evaluados se encuentran con un buen porcentaje de fertilización a pesar de ser toros muy jóvenes. En los resultados de fertilidad *in Vitro*, no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre los cuatro toros evaluados.
2. Los resultados observados en la tasa de producción de blastocistos en relación con el número de ovocitos madurados no existe diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre toros, lo cual confirma su buena capacidad fecundante.
3. Los resultados de motilidad post descongelación no tienen relación con la fertilidad *in Vitro* y la producción de embriones ya que la técnica de capacitación espermática separa los mejores espermatozoides de cada toro.

5. Referencias bibliográficas

- Alberio. R. 2003. Nuevas Tecnologías Reproductivas. Aspectos Biológicos y Económicos. Departamento de Reproducción Animal. INTA Balcarce. Pg. 13. Junio de 2003.
- Arlotto T., Schwartz I.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.
- Bastidas. P., Fernandez. A. y Troconiz. 1.1999. Fertilización *in Vitro* Heteróloga en Búfalos. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Aragua, Venezuela.
- Decuadro.H, Rue. C. 2000. Fertilidad de los toros de inseminación artificial: Algunos factores de variación. IMV Technologies France. Centre

- d'Insémination artificielle de L' Aigle, France.
- Galli, c., 2003. Bovine Embryo Technologies. Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione. Istituto IO Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani. Via Procellasco 7/F. Cremona 26100 Italia. *Theriogenology* 59 (2003) 599-616.
- Lorenzo L, 1994. Fecundación y desarrollos embrionario temprano. Fecundación in Vitro. Reproducción de los Animales Domésticos. Primera Edición. Área de Fisiología. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Complutense Madrid. Pág. 182:187.
- Madrid.N. 2003. Relación entre los Métodos de Valoración Seminal in Vitro y la Fertilidad in vivo del Semen Descongelado de Toros Frisones Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina Veterinaria.
- Olivera. M, 2003. Producción de Embriones F1 BON, para la caracterización de doble propósito y. como apoyo a la cadena Láctea y cárnica. Fisiología y Biotecnología de la Reproducción, Grupo de Reproducción-Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.
- Palma. 2001. Producción in vitro de Embriones Bovinos. Factores que Afectan los Resultados (Semen). Biotecnología de la Reproducción Gustavo. A. Palma. Primera Edición. 2001. Balcarce. Argentina. Pago 257: 259.
- Ramírez O., Jiménez E. 2003 MV. Profesor Asistente. Universidad Nacional. MV, Recolección de Ovocitos para Procedimientos in Vitro en Bovinos.
- Rei, M., Ratto, M. Silva, M. & Berland M., 2006. Desarrollo Embrionario in Vitro de ovocitos bovinos fecundados con espermatozoides adheridos al cumulus. Internacional.
- Salgado R, Rugeles C, Álvarez J. 2005. Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de ovocitos bovinos *in Vitro*. Programa de Reproducción animal Programa de morfofisiología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba.