

Evaluación de la maduración in vitro de ovocitos bovinos por la presencia del primer cuerpo polar y la tinción de hoechst

Assessment of in vitro maturation of bovine oocytes by the presence of the first polar body and hoechst staining

Mejía-Flores Itzayana¹, Hernández-Ignacio Javier², Chiquete-Félix Natalia³, Cornejo-Cortes Miguel Angel⁴, Lammoglia-Villagómez Miguel Ángel⁵

¹Departamento Ciencias Pecuarias. Universidad Nacional Autónoma de México - FES Cuautitlán. Campo Cuatro, Km. 2.5 Carr. Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastian Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. ²Departamento de Reproducción FMVZ-UNAM. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO, C.U., Distrito Federal, 04510, México. ³Laboratorio 305 ote, Insituto de Fisiología Celular-UNAM. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO, C.U., Distrito Federal, 04510, México. ⁴Departamento Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México - FES Cuautitlán. Campo Cuatro, Km. 2.5 Carr. Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastian Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. ⁵Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Región Poza Rica–Tuxpan.

NOTA SOBRE LOS AUTORES

Mejía-Flores Itzayana: nayazaitmf@cuautitlan.unam.mx  <https://orcid.org/0000-0001-7282-9158>

Hernández-Ignacio Javier: tysonjhi@hotmail.com  <https://orcid.org/0000-0003-0016-2934>

Chiquete-Félix Natalia: nchiquete@ifc.unam.mx  <https://orcid.org/0000-0002-5850-6536>

Cornejo-Cortes Miguel Angel: mcornejocortes@yahoo.com.mx  <https://orcid.org/0000-0002-6546-5189>

Lammoglia-Villagómez Miguel Ángel: mlammoglia@uv.mx  <https://orcid.org/0000-0002-2958-0518>

Esta investigación fue financiada con recursos de los autores.

Los autores no tienen ningún conflicto de interés al haber hecho esta investigación.

Remita cualquier duda sobre este artículo a Itzayana Mejía-Flores.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue emplear la tinción de Hoechst 33342 para confirmar la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos además de la identificación del primer cuerpo polar. Se utilizaron 48 ovarios obtenidos en el rastro al momento del sacrificio de las vacas, estos fueron transportados en SSF con 1% de antibiótico a temperatura ambiente. Una vez en el laboratorio los ovocitos se obtuvieron por medio de aspiración de folículos con un diámetro de 2-6 mm. Se seleccionaron ovocitos calidad I y II, según la clasificación de Loos y las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), y cultivados para su maduración en medio TCM-199, adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.5 µg/ml de FSH, 0.1 UI/ml de hCG, 50 µg/ml de gentamicina y 0.2 mM/ml de piruvato de sodio, bajo condiciones de 5% de CO₂, 38.5 °C y 100% de humedad relativa durante 24 horas. Los ovocitos que presentaban el primer cuerpo polar, fueron considerados como maduros, y seleccionados para confirmar el estado meiótico mediante la tinción de Hoechst 0.5 µg/ml 33342 por 10 minutos, para confirmar el estado de maduración. Los resultados obtenidos fueron de 88% de ovocitos con buena expansión del cúmulo, y un 72.7% de maduración confirmada por la tinción de Hoechst 33342; se concluye que es fundamental evaluar con técnicas confiables cada una de las etapas involucradas con la técnica de fin, para entender las variaciones en los resultados con los distintos protocolos empleados para la maduración de ovocitos *in vitro*.

Palabras Claves: Ovocito, bovino, maduración, Hoechst 33342.

ABSTRACT

The aim of this study was to use Hoechst 33342 staining to confirm *in vitro* maturation of bovine oocytes in addition to the identification of the first polar body. Forty-eight ovaries obtained from the slaughterhouse at the time of cow slaughter were transported in SSF with 1% antibiotic at room temperature. Once in the laboratory, the oocytes were obtained by aspiration of follicles with a diameter of 2-6 mm. Quality I and II oocytes, according to Loos classification and International Embryo Transfer Society (IETS) standards, were selected and cultured for maturation in TCM-199 medium, added with 10% fetal bovine serum (FBS), 0.5 µg/ml FSH, 0.1 IU/ml hCG, 50 µg/ml gentamicin and 0.2 mM/ml sodium pyruvate, under conditions of 5% CO₂,

38.5 °C and 100% relative humidity for 24 hours. Oocytes presenting the first polar body were considered mature and selected to confirm the meiotic stage by Hoechst 0.5 µg/ml 33342 staining for 10 minutes, to confirm the maturation stage. The results obtained were 88% of oocytes with good expansion of the cumulus, and 72.7% of maturation confirmed by Hoechst 33342 staining; it is concluded that it is essential to evaluate with accurate techniques each of the stages involved in the technique, to understand why there are variations in the results with the different protocols used for in vitro oocyte maturation.

Keywords: Oocyte, bovine, maturation, Hoechst 33342.

INTRODUCCION

La selección genética y los esquemas de cruzamiento pueden ser optimizados con la producción de embriones in vitro (PEIV). Esta última técnica está integrada por tres etapas: maduración in vitro de ovocitos (MIV), fertilización in vitro (FIV) y cultivo in vitro de los embriones para su desarrollo (CIV). Los resultados logrados actualmente con la PEIV son alrededor del 30 a 40 % de blastocistos. Estos resultados tan bajos han sido atribuidos entre otras cosas a la población heterogénea de ovocitos obtenidos de los folículos presentes en los ovarios (Baruselli et al., 2006; Ward et al., 2002; Van Blerkom et al., 1990). De manera general el material biológico para la obtención de los ovocitos son de los ovarios obtenidos de vacas sacrificadas en rastro a través de la aspiración folicular; colectándose solo los ovocitos de los folículos de 2 a 6 mm de diámetro. La maduración del ovocito es definida como el reinicio y terminación de la primera división meiótica, con la subsecuente progresión a metafase II, y los procesos nuclear y citoplasmático, son esenciales para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Sirar, 2011; Gordon, 2003). Dentro de los procesos nucleares se da la reducción del número de copias maternas, el rompimiento de la vesícula germinal, y el ovocito transcripcionalmente quiescente reinicia la meiosis, este proceso culmina con la expulsión del primer cuerpo polar y el arresto de la cromatina materna en metafase II (Sirar, 2011). Los cambios marcados que ocurren en el ovoplasma son colectivamente referidos como maduración citoplasmática e incluyen modificaciones en el citoesqueleto como son la redistribución de organelos, reducción de los niveles de RNAm y cambios en los patrones de

síntesis proteica. Dentro del folículo existen diferentes tipos de células somáticas que rodean al ovocito (Epigg, 2001). La comunicación bi-direccional entre el ovocito y las células somáticas es importante en el crecimiento y maduración del ovocito (Gilchrist et al., 2008). La morfología de las células del cumulus, que rodean al ovocito ha sido comúnmente utilizado desde tiempo atrás como un criterio de selección para incluir a los ovocitos que serán madurados in vitro (Bunel, 2015; Gilchrist et al., 2004; Matzuk et al., 2002; Epigg, 2001; Shioya et al., 1998).

El grado de expansión de las células del cumulus puede ser usado como un indicador morfológico de la maduración del ovocito. Sin embargo es discutible en cuanto a sí la expansión de las células del cumulus esta directamente relacionada con la capacidad de desarrollo y maduración del ovocito (Luciano et al., 2004; Ali A, 2002; Goud et al., 1998).

Hoechst es un fluoroforo utilizado de manera rutinaria para teñir DNA en embriones para evaluar FIV. Este fluorescente sintético penetra la membrana de la células y actúa en un sitio específico del DNA tiñéndolo, pero su empleo para identificar la maduración no es muy común. El interés de corroborar si la expansión de las células del cumulus en ovocitos madurados in vitro coincide con la presencia del primer cuerpo polar, radica en emplear como un criterio confiable la expansión de las células de cumulus para seleccionar a los ovocitos madurados para FIV. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar la maduración de ovocitos bovinos identificando la presencia del primer cuerpo polar con el apoyo de un microscopio estereoscópico y confirmado por la tinción de Hoechst 33342.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 48 ovarios de vacas sacrificadas en rastro, los cuales se transportaron a una temperatura de 25–30 °C, mantenidos en solución salina fisiológica con antibiótico (1ml/L de gentamicina) para su conservación. Una vez en el laboratorio los ovarios fueron lavados con SSF a temperatura ambiente (20-25 °C) las veces necesarias para descartar detritus celulares y sangre. Colección y Maduración In Vitro de ovocitos.

El complejo cumulus-ovocito (CCO) fue obtenido por el método de aspiración, utilizando una aguja del numero 18 y una jeringa hipodérmica de 5 ml con medio de manipulación (TCM-199

más 25mM de HEPES) a partir de folículos con un diámetro de 2-6 mm. Después de la aspiración de los folículos, se llevó a cabo la disección de los mismos, utilizando una hoja de bisturí para realizar cortes transversales y longitudinales en la superficie de los ovarios; las incisiones fueron lavadas con medio de manipulación (TCM-199 y 25 mM HEPES) a temperatura de 23-25 °C, empleando una jeringa hipodérmica de 10 ml y una aguja del número 16. El líquido colectado del lavado, así como el obtenido de la aspiración se colocó en cajas de petri para localizar los ovocitos con un microscopio estereoscópico. Los ovocitos localizados se depositaron en un caja de petri con medio de manipulación a 25° C previamente calentado y con el apoyo de un microscopio estereoscópico se clasificaron los ovocitos por: el número de capas de células de la granulosa que posea, coloración uniforme del núcleo, integridad de la zona pelúcida, de acuerdo a la clasificación más empleada actualmente que es la de Loss F, 1989 y las normas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).

Para la maduración se utilizaron aquellos ovocitos clasificados como tipo I y II, y se incubaron en el medio de cultivo TCM-199, adicionado con 10% suero fetal bovino (SFB), 0.5 µg/ml de FSH, 0.1 UI/ml de hCG, 50 µg/ml de gentamicina y 0.2 mM de piruvato de sodio, bajo las siguientes condiciones: 5% de CO₂, 38.5 °C de temperatura y 100% de humedad relativa.

Después de 24 hrs en cultivo los ovocitos fueron transferidos a tubos eppendorf que contenían 0.1% de hialuronidasa en medio de manipulación suplementado con 4 mg/ml de sero albumina bovina (fracción v) y fueron desnudados utilizando el vortex por 2 minutos para eliminar todas las células del cumulus (Stojkovic et al., 2001).

Evaluación de la maduración.

Los ovocitos que presentaban el primer cuerpo polar, fueron considerados como maduros, y seleccionados para confirmar el estado meiótico mediante la tinción de Hoechst 33342 de la cromatina. Los ovocitos desnudos fueron fijados en 4% formaldehído en DPBS, y permeabilizados con 0.2% Triton X-100 y 0.1% Tween-20 en DPBS por 40 min, lavados 3 veces en DBS/BSA y teñidos 0.5 µg/ml de Hoechst 33342 por 10 min para confirmar el estado de maduración. Después de lavarlos, los ovocitos fueron montados en laminillas y observados bajo un microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron 4 repeticiones, en total se maduraron 158 ovocitos (Tabla 1), de los cuales 139 (88%) presentaron buena expansión de las células del cumulus (Fig.1 a y b), se eliminaron 19 debido a que no expandieron; 107 (72.7%) de los 139 que tuvieron buena expansión de las células del cumulus tuvieron presencia del primer cuerpo polar, la cuál se confirmó por medio de la tinción de Hoechst 33342 (Fig.2), observando la metafase II de la meiosis.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que existe un 15.3 % menor de ovocitos maduros confirmados mediante la tinción de Hoetch, y que la expansión de las células del cumulus no indica que el 100% de los ovocitos expandidos hayan madurado.

Tabla 1. Porcentaje de ovocitos de bovino madurados in vitro tomando como parámetros la expansión de las células del cumulus, la presencia del primer cuerpo polar y la tinción de Hoechst.

	OVOCITOS MADURADOS	CALIDAD 1	CALIDAD 2	OVOCITOS CON EXPANSIÓN CÉLULAS DEL CUMULUS		TINCIÓN DE HOECHST
				BUENA	NULA	
No. de ovocitos	21	11	10	18/21=85.7%	3	9/18=50%
No. de ovocitos	52	32	20	43/52=82.5%	9	41/43=95.3%
No. de ovocitos	45	25	20	40/45=88.8%	5	34/40=85%
No. de ovocitos	40	22	18	38/40=95%	2	23/38=60.5%
Promedio	158			88%		72.7 %

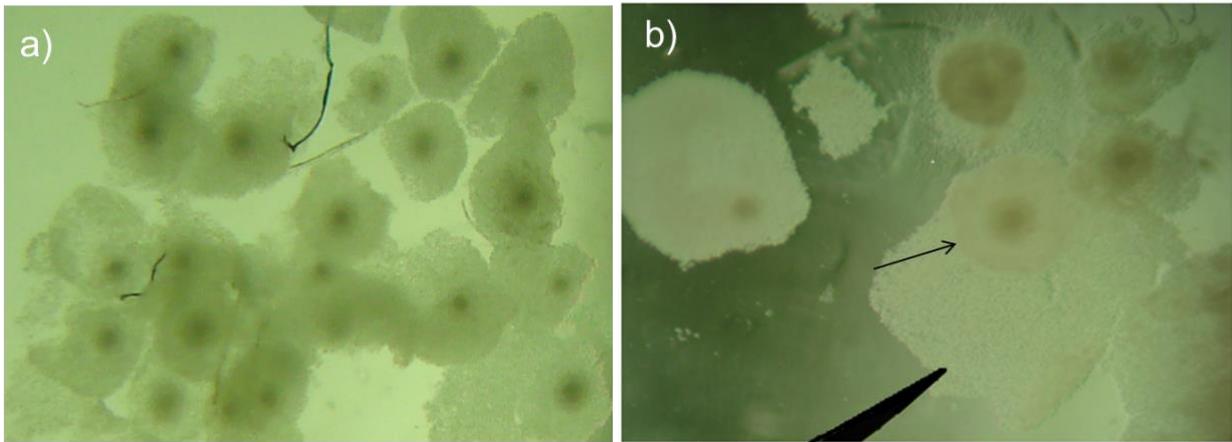


Fig. 1 a) Ovocitos de bovino madurados in vitro con el protocolo 5 donde se muestra la expansión de las células del cumulus. b) Mayor aumento de los ovocitos (200X). (Flecha señala al ovocito y punta de flecha indica las células del cumulus en expansión).

La maduración nuclear esta definida como la proporción de ovocitos que desarrollan a MII. In vivo la oleada preovulatoria de LH estimula al ovocito en dictioteno (arrestado en profase I) para reiniciar la meiosis. En la mayoría de los casos, el ovocito ha completado su maduración antes de la ovulación, mientras que el reinicio de la meiosis in vitro ocurre espontáneamente cuando el complejo cumulus-ovocito (CCO) es removido del folículo e incubado bajo condiciones adecuadas (Pilar Coy, 2005; Pincus y Enzmann, 1935). Por lo que es importante seleccionar los CCO's que tengan una calidad 1 ó 2 ya que provienen de una población extremadamente heterogénea en cuanto a calidad, estado meiotico y de desarrollo (Auclair S, 2013). Auclair, 2013 en su trabajo de investigación empleo para la medir el estado meiotico de los ovocitos la tinción de Hoechst, en donde reporta un 89.3% en metafase II en ovocitos con células del cumulus y un 88.2% con ovocitos desnudos no encontro una diferencia significativa en el porcentaje de maduración entre ambos grupos; sin embargo en el proceso de fertilización in vitro, la tasa de desarrollo embrionario se vio reducida en un 50% en aquellos ovocitos madurados desnudos con respecto a los que mantengan el complejo cumulus-ovocito. La comprobación del estado de maduración y del desarrollo embrionario se realizo mediante la utilización de Hoechst 33342, lo que demuestra el empleo de dicha técnica para evaluar ambos procesos.



Fig. 2. Ovocito de bovino teñidos con Hoechst 33342. a) Contraste de fases de un ovocito. b) Ovocito observado en microscopio de fluorescencia donde las flechas indican la presencia del

DNA. c) Misma imagen del ovocito en b) observado a mayor aumento (400X) la flecha continua señala el DN del primer cuerpo polar y la flecha punteada señala los cromosomas en metafase II. Alvarádo, 2018 reporta el empleo de la tinción de Hoechst 33342 como método para evaluar la maduración nuclear de los ovocitos in vitro, sus resultados muestran un 66% de ovocitos madurados in vitro, estos resultados son menores a lo obtenido en el presente estudio; la importancia es su empleo tanto en la maduración in vitro como para el desarrollo embrionario, es decir es un técnica que nos permite evaluar ambos procesos.

En un estudio realizado en 2001, donde seleccionaron la calidad del CCO's, Mayes y Sirard, no encontraron una diferencia significativa en el grado de maduración entre los ovocitos calidad 1 y 2, sin embargo encontró una disminución significativa en los ovocitos madurados clasificados como calidad 3 y 4.

Khurana y Niemann, 2000 reportan diferencias en las tasas de maduración, fecundación y desarrollo entre los diferentes grupos de ovocitos, para la producción de embriones, y que a excepción de los diferentes grados de las células del cumulus, los ovocitos que pertenecen a la diferentes categorías morfológicas fueron expuestos a condiciones similares para la producción de embriones in vitro, los resultados obtenidos indican un papel importante de las células del cúmulo en estos procesos.

En estos dos últimos estudios, se confirmó el estado de maduración por la tinción con aceto-orceína, y se verificó por la presencia del primer cuerpo polar. Una de las ventajas del empleo de la tinción de Hoechst en comparación con la tinción de aceto-orceína es que no se requiere de una capacitación previa y tampoco de experiencia para interpretar la tinción de la cromatina, es muy confiable ya que se observa claramente el estado de metafase II de la cromatina.

Los resultados obtenidos en ovocitos bovinos madurados in vitro por los trabajos antes mencionados son similares a los logrados en este trabajo. La diferencia en los porcentajes alcanzados en este estudio entre ovocitos expandidos y aquellos que presentaban cuerpo polar, posiblemente se deba al efecto de las gonadotropinas sobre las células del cumulus que contenía el medio de maduración.

CONCLUSIONES

Con estos datos logrados en este estudio, se concluye que es necesario evaluar con técnicas confiables cada una de las etapas involucradas con la técnica de fin, para entender porque se presentan variaciones en los resultados con los distintos protocolos empleados para la maduración de ovocitos in vitro.

LITERATURA CITADA

- Ali A y Sirard MA. 2002. Efecto de la ausencia o presencia de varios suplementos proteicos en el desarrollo posterior de ovocitos bovinos durante la maduración in vitro. *Biología de la Reproducción*; 66:901-905. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.901>
- Alvarado JA, Pradieé J, Härter M, Veiras T, Mion B, Garziera B, Tomazele M, Nunes M, Cantarelli LM, Schneider A. 2018. Efecto de la lipoproteína de alta densidad sobre la maduración de ovocitos y el desarrollo de embriones bovinos in vitro. *Reprod Dom Anim*. 2019; 54:445–455. <https://doi.org/10.1111/rda.13373>
- Auclair S, Uzbekov R, Elis S, Sanchez L, Kireev I, Lardic L, Dalbies-Tran R y Uzbekova S. 2013. La ausencia de células del cúmulo durante la maduración in vitro afecta el metabolismo de los lípidos en los ovocitos bovinos. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 304: E599–613. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00469.2012>
- Baruselli PS, Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM & Bó GA 2006. Superovulación y transferencia de embriones en bovinos *Bos indicus*. *terioenología*; 65:77-88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.006>
- desarrollo de embriones bovinos in vitro. *Reprod Dom Anim*; 54:445–455.
- Bunel A., Jorssen EP, Merckx E., Leroy JL, Bols PE, Sirard MA 2015. Producción individual de embriones bovinos in vitro y análisis transcriptómico de células de cúmulo para distinguir complejos de cúmulo-ovocitos con alto o bajo potencial de desarrollo. *terioenología*; 83. 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.019>
- Coy P, Romar R, Payton RR, McCann L, Saxton AM y Edwards JL. 2005. Mantenimiento de la detención meiótica en ovocitos bovinos usando el enantiómero S de roscovitina: efectos

- sobre la maduración, fertilización y posterior desarrollo embrionario in vitro. *Reproducción*; 129:19–26. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00299>
- Epigg JJ. 2001. Control de ovocitos del desarrollo y función folicular ovárico en mamíferos. *Reproducción*; 122:829-838. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829>
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. 2008. Factores secretados por ovocitos: reguladores de la función de las células del cúmulo y la calidad de los ovocitos. *Actualización de la reproducción de Hum*; 14:159–177. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. 2004. Interacciones entre ovocitos y células somáticas durante el desarrollo del folículo en mamíferos. *Animación reprod. ciencia*; 82–83:431–46. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.017>
- Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P y Dhont M. 1998. Maduración in vitro del ovocito en etapa de vesícula germinal humana: papel de las células del cúmulo y el factor de crecimiento epidérmico en el medio de cultivo. *Reproducción Humana*, 13:1638-1644. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1638>
- Khurana NK y Niemann H. 2000. Efectos de la calidad de los ovocitos, la tensión de oxígeno, la densidad del embrión, las células del cúmulo y los sustratos de energía en la formación de blastocistos de división y mórula de embriones bovinos. *teriogenología*; 54:741-766. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00387-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00387-3)
- Loos F., Van Vliet C., Van Maurik P y Kruij Th. AM 1989. Morfología de ovocitos bovinos inmaduros. *Gameto Res*; 24:197-204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>
- Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanesi E, Lauria A y Gandolfi F. 2004. Papel de la concentración de 3',5'-monofosfato de adenosina cíclica intracelular y las comunicaciones entre las células del cúmulo y el ovocito en la adquisición de la competencia de desarrollo durante la fase in vitro maduración del ovocito bovino. *Biología de la Reproducción*; 70:465-472. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020644>
- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. 2002. Comunicación intercelular en el ovario de mamíferos: los ovocitos llevan la conversación. *Ciencia*; 296:2178–80. <https://doi.org/10.1126/science.1071965>

- Mayes MA y Sirard MA. 2001. La influencia de la morfología del complejo cúmulo-ovocitos y los inhibidores meióticos en la cinética de la maduración nuclear en el ganado. *teriofenología*; 55:911-22. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00453-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00453-8)
- Pincus, G. y EV Enzmann, 1935. El comportamiento comparativo de huevos de mamíferos in vitro e in vivo. *Exp. J. Medicina*. 62:665-675. <https://doi.org/10.1084/jem.62.5.665>
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M e Iwasaki. 1998. Fertilización in vitro y capacidad de escisión de ovocitos foliculares bovinos clasificados por células del cúmulo y madurados in vitro. *Teriofenología*, 30:489-496. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90198-7)
- Sirard MA. 2011. Ambiente folicular y calidad de ovocitos madurados in vitro. *J ayuda a Reprod Genet*; 28: 483-488. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9554-4>
- Stojkovic Miodrag, Machado Sergio A., Stojkovic Petra, Zakhartchenko Valeri, Hutzler Peter, Goncalves Paolo B. and Wolf Eckhard. 2001. Distribución mitocondrial y contenido de trifosfato de adenosina de ovocitos bovinos antes y después de la maduración in vitro: correlación con criterios morfológicos y capacidad de desarrollo después de la fertilización y cultivo in vitro. *Biología de la Reproducción*; 64:904-909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>
- Van Blerkom J, Bell H, Weipz D. 1990. Aspectos biológicos celulares y del desarrollo de la maduración meiótica bovina, la fertilización y la embriogénesis preimplantacional in vitro. *J Técnica de Microscopía Electrónica*; 16:298-323. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060160404>
- Ward Fabian, Enright Brian, Rizos Dimitrios, Boland Maurice, Lonergan Patrick. 2002. Optimización de la producción de embriones bovinos in vitro: efecto de la duración de la maduración, duración de la coincubación de gametos, concentración de espermatozoides y padre. *teriofenología*; 57:2105-2117. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00696-9)
- Gordon I. En: *Laboratorio de producción de embriones de ganado*. 2ª ed. Cambridge: CAB Internacional, University Press; 2003.

Copyright © 2022 Mejía-Flores Itzayana, Hernández-Ignacio Javier, Chiquete-Félix Natalia, Cornejo-Cortes Miguel Angel y Lammoglia-Villagómez Miguel Ángel.



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](#).
Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)