



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS

Fertilización *In Vitro* de ovocitos en cultivo primario de endometrio
en ratones de la cepa CD-1.

Tesis presentada para obtener el título de

LICENCIADO (A) BIOLOGÍA

PRESENTA:

ARELI GALLARDO NAVARRO

TUTORA: ROSALINA MARÍA DE LOURDES REYES LUNA

MES Y AÑO
JUNIO 2016



Índice General

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	8
3. Justificación.....	12
4. Objetivo Principal	13
4.1 Objetivos Particulares.....	13
5. Hipótesis.....	14
6. Material y Métodos.....	15
6.1 Preparación del medio de células epiteliales endometriales	15
6.2 Cultivo endometrial con colagenasa.....	15
6.3 Cultivo endometrial sin colagenasa	16
6.4 Obtención de ovocitos.....	17
6.5 Obtención de espermatozoides.....	17
6.6 Fertilización <i>In vitro</i>	18
6.7 Recuperación de embriones obtenidos por fertilización <i>in vitro</i>	18
6.8 Obtención de micrografías	18
7. Resultados	19
7.1 Morfología de ovocitos fertilizados.....	27
8. Discusión	30
9. Conclusión.....	33
10. Anexos.....	34
11. Bibliografía	39

Resumen

Introducción. Los problemas de infertilidad han aumentado en un 20% en la población mundial y es definida como la imposibilidad de una pareja de lograr un embarazo después de un año de vida sexual activa, sin uso de anticonceptivos. Las técnicas de reproducción asistida más utilizadas para el tratamiento de la infertilidad son la fertilización *in vitro* (*FIV*), inseminación artificial (IE) y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La finalidad de la FIV es conseguir embriones capaces de desarrollarse, implantar y dar lugar a nacimientos viables. El éxito de esta técnica está comprometido por las condiciones de cultivo, que afecta el desarrollo y viabilidad embrionaria. Los cocultivos de los embriones con células somáticas asemeja las condiciones *in vivo*, absorbe toxinas del medio, proporciona nutrientes a los embriones y permite un mejor desarrollo embrionario.

Objetivo.

Determinar si la participación de los cultivos primarios de endometrio mejoran el proceso de la fertilización *in vitro* en ratones de la cepa CD-1.

Resultados. Se estandarizaron los cultivos de células endometriales sin la utilización de la enzima Colagenasa IA, a partir de una biopsia del tejido uterino en cajas Petri con medio DMEM adicionado incubándolas a 37°C en una atmósfera de aire y CO₂ al 5% durante 24 hrs. Sobre estos cultivos se realizaron 21 experimentos de *FIV*, y se observó que a las 18 h, 54% de los ovocitos habían sido fecundados (presencia de pronúcleos y segundo cuerpo polar). Además se observó el desarrollo de los embriones en etapa de 2, 3, 4, 8 células y mórula. Presentaron características morfológicas normales, blastómeras simétricas, membrana plasmática bien delimitada, con tamaño uniforme y zona pelúcida intacta.

Conclusión: El Cultivo de células endometriales favorece el proceso de la fertilización *in vitro* en ratones de la cepa CD-1.

1. Introducción

En la actualidad, los problemas de infertilidad han aumentado en un 20% en la población mundial. La infertilidad, está definida como la imposibilidad de una pareja de lograr un embarazo después de un año de vida sexual activa, sin uso de anticonceptivos. (Dalia A y Ojeda N, 2008).

De acuerdo con cifras emanadas de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008), alrededor del 15% de las parejas en edad de concebir acude al médico por infertilidad, habitualmente después de unos dos años de no lograr el embarazo deseado. En términos generales, la fuente de infertilidad puede establecerse, según la OMS, de la siguiente manera:

- Exclusivamente femenina en alrededor de 30-40% de los casos.
- Exclusivamente masculina en alrededor de 10-30% de los casos.
- Una combinación de los miembros de la pareja con anomalías detectables en 15-30% de los casos.

La OMS estima que hay alrededor de 60 a 80 millones de parejas infértiles en el mundo. (Dalia A y Ojeda N, 2008).

Por ende las Técnicas de Reproducción Asistida en los últimos años han ganado gran auge. Las técnicas de reproducción asistida más utilizadas en las últimas décadas son la fertilización *in vitro* (FIV), Inseminación artificial (IE), y la Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La finalidad de la fertilización *in vitro* (FIV) y el cultivo embrionario es conseguir embriones de buena calidad capaces de desarrollarse e implantar, lo que da lugar a nacimientos viables, por lo que el éxito de esta técnica esta sensiblemente comprometido por las condiciones de cultivo, que puede afectar el desarrollo embrionario normal y traer una disminución o perdida de la viabilidad embrionaria. Desde los comienzos de estas técnicas hasta hoy día se han logrado progresos considerables. En los últimos 15 años se ha conseguido desarrollar medios de

cultivo más fisiológicos, efectivos y capaces de mantener la viabilidad de los embriones *in vitro*.

La fertilización es el proceso por el cual, se lleva a cabo la interacción exitosa de un óvulo con un espermatozoide previamente maduro. Según Epel (1977), dicho proceso consta de cuatro etapas principales:

1. Maduración funcional del espermatozoide (capacitación)
2. El reconocimiento del óvulo por el espermatozoide, que ocurre cuando este entra en contacto con la capa que envuelve al óvulo llamada zona pelúcida.
3. La regulación de la entrada de un espermatozoide al óvulo.
4. La activación del metabolismo del óvulo para que se inicie la división celular y el desarrollo embrionario.

Sin embargo, la fecundación *in vitro* se ha definido como la penetración de espermatozoides con capacidad de fecundar en ovocitos maduros fuera del tracto genital femenino. (Greve y cols, 1991).). En la fertilización *in vitro* se trata de imitar, por medio de metodologías y protocolos las condiciones y los eventos que suceden fisiológicamente en la región ampular del oviducto, específicamente durante la interacción entre gametos y la formación de pronúcleos.

La utilización de ovocitos y espermatozoides en un sistema *in vitro* permite analizar con mayor detalle las diferentes fases del proceso de fecundación que no pueden ser exploradas *in vivo*, por consiguiente se considera un método adecuado para medir la fertilidad del macho (capacidad fecundante del espermatozoide) (Gadea, 2001).

El desarrollo inicial de los mamíferos se extiende desde la fecundación hasta la implantación del embrión en el endometrio. Esta etapa culmina con la formación del blastocisto, en el cual se distinguen, por primera vez, dos tipos celulares, la masa celular interna y el trofoblasto. Comprende, además divisiones celulares, compactación y la diferenciación celular del blastocito (Fig. 1). La fecundación ocurre en la porción ampular de las trompas y, desde allí, el embrión es impulsado

hacia el útero. Este tránsito dura entre 5 y 6 días, siendo en este trayecto cuando se realiza la segmentación. La primera división ocurre 25-27 horas después de la fecundación y las siguientes divisiones ocurren aproximadamente cada 12 horas. (Sepúlveda J, 2008) Sin embargo, no son sincrónicas, lo que hace posible encontrar embriones con diversos números de células, aunque sean más frecuentes las potencias de dos.

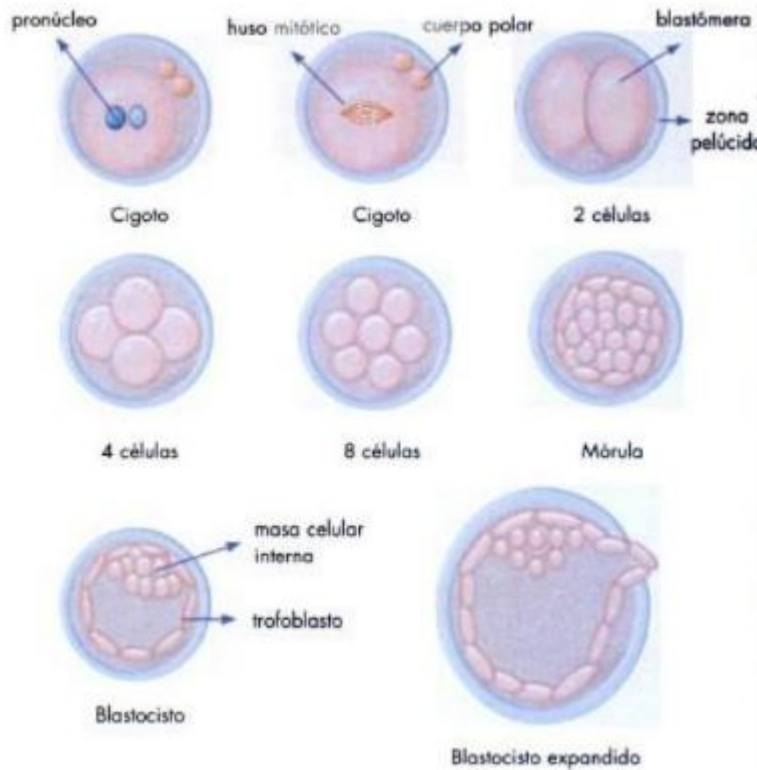


Fig. 1. Esquema del desarrollo inicial en mamíferos. Podemos observar el desarrollo embrionario desde la fusión de los pronúcleos que formara el huso mitótico en el cigoto, y empezara la división del embrión en etapa de 2, 4, 8 células y mórula hasta llegar hasta blastocisto, listo para implantación. (Tomado de Lerner y Urbina, 2008).

En cuanto a la implantación embrionaria, conocida también como nidación, es el proceso mediante el cual el embrión, en estadio de blastocisto, se aloja en el endometrio materno para continuar su desarrollo. El sitio natural de la implantación embrionaria humana es el tercio medio y superior de la pared posterior del útero (Ishihara y cols, 2003). Durante este proceso debe existir un diálogo entre el

trofoblasto embrionario y el endometrio materno. El periodo en el que se produce este dialogo debe suceder de manera sincronizada entre el embrión, en estadio de blastocisto, y un momento específico del ciclo menstrual considerado como el periodo de máxima receptividad uterina, denominado ventana de implantación (Valles y cols, 2006). El proceso de implantación transcurre a su vez en 4 procesos consecutivos que se desarrollan en dos periodos: un periodo preimplantatorio, en donde ocurre la aposición y un periodo implantatorio que incluye los procesos de adhesión, intrusión e invasión (Besereni S, 2008). (Fig. 2)

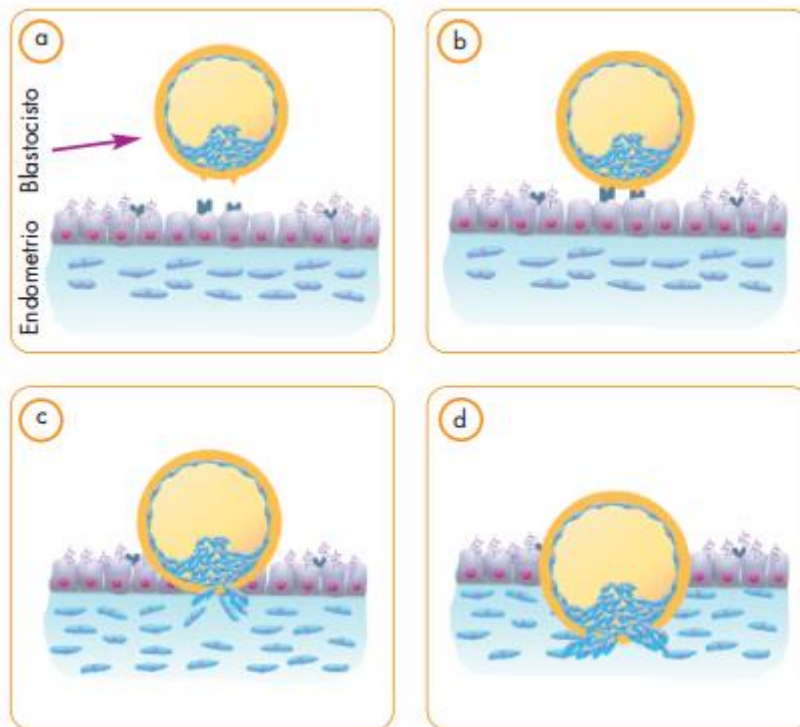


Fig. 2. Diagramas que representan el proceso de implantación de un embrión en el endometrio: a) aposición; b) adhesión; c) intrusión; d) invasión. (Tomado de Lerner y Urbina 2008).

El endometrio humano es la mucosa que tapiza la cavidad uterina. Actualmente se le considera un órgano regulado hormonalmente que sufre cambios periódicos con forme se presenta el ciclo menstrual propio de seres humanos. Estos cambios van a servir para su preparación en la adquisición del estado receptivo imprescindible

para la implantación embrionaria y el desarrollo de la gestación. El endometrio humano se encuentra constituido por un compartimiento epitelial, uno estromal y otro vascular con la existencia además, de una población de células inmunes residentes. Todo ello se encuentra situado en dos regiones denominadas *funcionalis* y *basalis*. La primera se transforma y regenera cada mes, mientras que la *basalis* permanece y constituye la base para regenerar cíclicamente el endometrio. (Fig. 3)

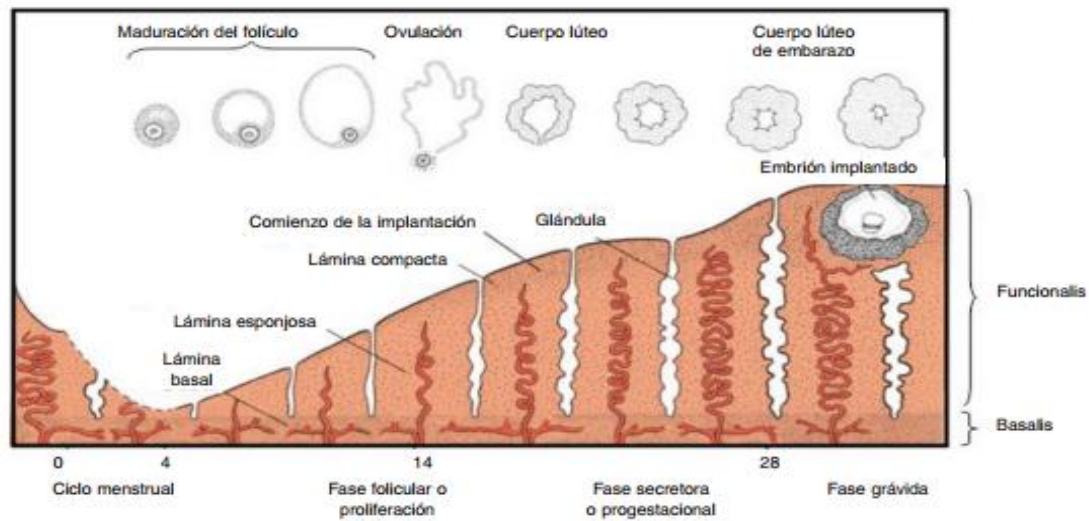


Fig.3. Diagrama representativo de la dinámica del endometrio humano durante el ciclo menstrual. (Tomado de Simón, Horcajadas y cols, 2009).

El epitelio endometrial (E/E) consiste en una monocapa de células cuboidales polarizadas que tapizan el interior de la cavidad uterina y está constituida por un componente luminal y otro glandular (Simón y cols, 2002). Esta monocapa, como es resto de las mucosas, actúa como barrera para proporcionar protección contra los patógenos que logran acceder hasta la cavidad endometrial, pero también debe permitir regular la implantación del embrión que es, en esencia, la función primordial del endometrio.

Dicho epitelio endometrial está regulado por las hormonas esteroideas ováricas que, directamente o a través del estroma (Cooke y cols, 1997), inducen cambios morfológicos y bioquímicos cíclicos que ayudan a mantener un microambiente adecuado para la implantación del embrión. Su función en este proceso es

controlar la adhesión del embrión sobre el estroma y los vasos endometriales, actuando como primer mediador del dialogo entre embrión y el endometrio materno (Dominguez y cols, 2005). En cuanto el endometrio de ratón podemos localizar el epitelio luminal, el miometrio y los vasos sanguíneos (Fig. 4).

En ratón la probabilidad de fecundación es del orden del 40-60% de los óvulos, dependiendo de la calidad del espermatozoide, la línea de origen y la edad del macho donante, entre otros factores.

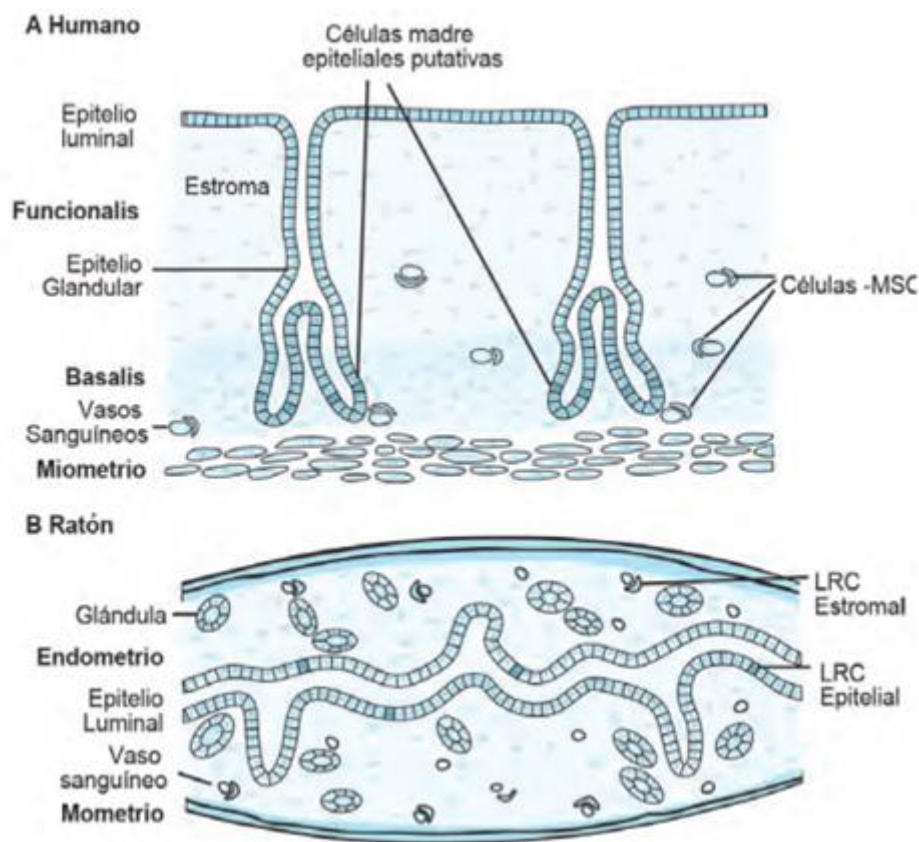


Fig. 4 Esquema comparativo del A) endometrio humano y B) endometrio de ratón. (Tomado de García-Velasco y cols, 2010).

2. Antecedentes

El cocultivo, es una técnica que consiste en mantener en el mismo sistema de cultivo a los embriones y alguna otra célula somática, que generalmente actúa como “nodriza” al absorber las toxinas del medio y proporcionar nutrientes a los embriones, lo que les permite un mejor desarrollo. (Medina GR, 2008) Uno de los primeros sistemas de cocultivo desarrollados se realizó con trompas de Falopio tratadas hormonalmente que sirvieron para cultivar embriones de ratón. Se obtuvieron experiencias exitosas con células autólogas de granulosa, células de epitelio endometrial y células Vero. (Biggers y cols, 1962)

El cocultivo es un sistema complejo que trata de asemejar las condiciones *in vivo*, al ofrecer un mejor equilibrio que los medios simples. La técnica del cocultivo difiere completamente de las de cultivo embrionario clásico. La elección del medio para el cocultivo embrionario es esencial: pues debe satisfacer las necesidades tanto del embrión como de las células. (Dorado M y cols, 2006)

Se ha experimentado con células epiteliales tubáricas, células endometriales, células del cúmulo y de la granulosa y células derivadas del epitelio renal en simios. Estos cultivos han arrojado tasas de desarrollo hasta blastocisto que sobrepasan el 60%. Este sistema de cocultivo mejora los resultados en pacientes con fallos repetidos en ciclos de fertilización *in vitro* (FIV). (Gadea, 2001)

Los sistemas de fertilización *in vitro* homólogos se desarrollaron inicialmente para la producción de embriones, aunque posteriormente les han dado otra clase de usos como la evaluación de los mecanismos fisiológicos implicados en la fecundación (Cox y cols., 1995). En el caso del espermatozoide, mediante estas pruebas se evalúa la capacitación espermática, la reacción acrosomal, la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida y su unión a la membrana plasmática del ovocito, además de la descondensación de su cromatina (Yanagimachi, 1984). Este tipo de sistemas implican, la maduración del ovocito, su fecundación y el cultivo embrionario *in vitro*.

Mientras que la fertilización *in vitro* heteróloga está ampliamente desarrollada en ovocitos de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). Esta técnica se emplea principalmente como análisis de la capacidad fecundante de los espermatozoides de diferentes especies, aunque también ha sido utilizada al igual que el sistema homólogo para el estudio de la fusión de los gametos. Este tipo de fertilización adquiere importancia en especies en donde los ovocitos homólogos son difíciles de obtener en grandes cantidades como lo son: el caso de la especie humana (Wang y cols, 1991), algunas especies de interés zootécnico como el caprino (Cox y cols, 1995) el ovino (Slavik y Fulka, 1990) y en especies en peligro de extinción.

En cambio el cocultivo de endometrio autólogo es una técnica de cultivo de embriones sobre una capa de células endometriales de la paciente. Su diferencia y ventaja respecto de las técnicas de fertilidad asistida tradicionales radica en que, través de ella, el crecimiento de los embriones sobre las células del endometrio materno provee un ambiente más natural y fisiológico para el desarrollo de los mismos. Además, dado que las células endometriales son derivadas de la misma paciente que posee los embriones, no existen riesgos de transmitir infecciones virales o bacterianas extrañas.

En las técnicas de Reproducción Asistida la tasa de éxito es de un 45% ya que un 20% de los ovocitos fecundados no llega a desarrollarse. Se ha reportado que los cultivos homólogos y heterólogos con tejidos mejoran la maduración de los ovocitos obtenidos de ovario, el proceso de la fecundación y el desarrollo embrionario (Goldberg, 2007).

Se han realizado algunos trabajos importantes acerca de la FIV y un ejemplo de ello es el primer ternero producto por FIV que nació en el año 1981. De esta forma Brackett y col en 1982, comprobaron el éxito de la fertilización *in vitro* con ovocitos madurados *in vivo*. El cultivo *in vitro* de los ovocitos fecundados constituyó un problema metodológico, con los medios de cultivo habituales se desarrollan los cigotos hasta un determinado número de divisiones celulares, que

varía según las especies. En la especie bovina el desarrollo se interrumpía en el estadio de 8-16 células. Para superar el desarrollo temprano insuficiente se emplearon medios de cultivo *in vivo*, en los cuales los cigotos o embriones de 2 células fueron cultivados en oviductos de oveja (Crister y col, 1986; Eyestone y col, 1987; Lu y col, 1988), de coneja (Bolando 1984; Sirard y col, 1985; Fukui y Ono, 1988) o de vaquillona (Xu y col, 1987) durante 4-6 días. Un nuevo camino para superar la interrupción del desarrollo embrionario fue empleando cultivos celulares. A través del cocultivo con determinadas células somáticas es posible alcanzar las condiciones adecuadas para lograr un desarrollo embrionario normal. Resultados comparativos indicaron que la presencia de células granulosas ofrece mejores condiciones para el desarrollo de los embriones frente a los medios de cultivo convencionales ya que se observa una mayor tasa de desarrollo y una mejor calidad de los embriones producidos. El desarrollo de mórulas y blastocistos empleando las células del cumulus es el doble. Aproximadamente un tercio de los ovocitos cultivados pueden transformarse en embriones transferibles (Berg y Brem 1990; Palma y col, 1992).

Mientras que en ovinos, los éxitos en desarrollo de embriones fertilizados *in vitro* en etapa de mórula o blastocisto habían sido muy limitados, sin embargo, en presencia de células epiteliales de oviductos de ovejas, se logró que cigotos producidos por FIV fueran cocultivados con un aumentó a un 35% la tasa de éxito en estado de mórula (Glew y col, 1988). El cultivo con estas células estimula al embrión a desarrollarse impidiendo el bloqueo de la segmentación que regularmente ocurre en los embriones de ovinos cuando alcanzan el desarrollo de 8 células. El mecanismo de cocultivo que estimula la continuidad del desarrollo del embrión no es conocido. Probablemente, las células epiteliales de oviducto secretan algún factor indispensable para el desarrollo embrionario. Los efectos de estas células sobre los embriones son relativamente específicos. Dicho efecto también ha sido demostrado en el cocultivo con vesículas trofoblásticas aumentando un 20% la tasa de desarrollo. (Heyman y col, 1987).

La fertilización *in vitro* y el desarrollo embrionario en ratón es el modelo más utilizado en la actualidad para el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida entre otros, debido a su bajo costo y fácil manejo. En el trabajo realizado por Brinster y Cross en 1970 se demostró que la maduración de ovocitos fue mayor (91,7%) cuando los ovocitos fueron cultivados con células del cumulus pero hubo una reducción en la maduración de ovocitos cuando se cultivaron sin dichas células (59,2%). Mientras que la fertilización *in vitro* de los ovocitos del oviducto, medido por el número de embriones que se encontraban en etapa de dos células fue mayor (90,1%), cuando el medio contenía células del cumulus. La eliminación de las células del cumulus del medio en donde se contenían los ovocitos antes de la fertilización redujo el número de embriones en etapa de dos células (90,1% al 46,3%).

3. Justificación

Actualmente los procesos de fertilización *in vitro* tienen una tasa de éxito reducida, uno de los posibles factores que afectan el éxito de la FIV son los medios de incubación convencionales que se han utilizado en las últimas décadas, lo que hace que los embriones alcancen con mayor dificultad la etapa de blastocito y, por ende, se vea comprometida la transferencia del embrión al endometrio de la paciente y que la implantación sea exitosa.

En estudios realizados por diferentes autores se han confirmado que al utilizar cocultivos autólogos y heterólogos se ha mejorado el desarrollo del embrión en la fertilización *in vitro*, teniendo así la posibilidad de aumentar la calidad ambiental y fisiológica de los embriones. Por este motivo en el presente proyecto se tiene como finalidad determinar si los cocultivos con células endometriales mejoran las condiciones fisiológicas para llevar a cabo el proceso de fertilización *in vitro* y garantizar posteriormente un mejor desarrollo embrionario y una buena implantación.

4. Objetivo Principal

Determinar si la participación de los cultivos primarios de endometrio mejoran el proceso de la fertilización *in vitro* en ratones de la cepa CD-1.

4.1 Objetivos Particulares.

- Estandarizar las condiciones óptimas para el cultivo primario de células endometriales de ratón.
- Determinar si el efecto de las células endometriales en cultivo favorecen el proceso de la fertilización *in vitro*.

5. Hipótesis

El cultivo de ovocitos en presencia de células endometriales de ratón de la cepa CD-1 facilitan el proceso de fertilización y desarrollo embrionario *in vitro*.

6. Material y Métodos

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biología de la Reproducción en la Escuela de Biología, en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Los animales utilizados fueron ratones hembra y macho de la cepa CD-1, de 10 semanas de edad, con peso aproximado de 30 a 50 grs, proporcionados por el Bioterio "Claude Bernard".

6.1 Preparación del medio de células epiteliales endometriales

Se utilizó medio básico DMEM suplementado con MCDB-105 e insulina al que se le añadió antibióticos para evitar posibles contaminaciones. El medio compuesto por 3 partes de DMEM, 1 de MCDB-105 suplementado con Gentamicina (100 µg/ml), Fungizona (05 µg/ml) e insulina (5 µg/ml). El medio se esterilizó por filtración utilizando un filtro de 0.22 µm. Después fue alicuotado y almacenado a 4°C.

6.2 Cultivo endometrial con collagenasa

Las biopsias de las células epiteliales y estromales del endometrio se obtuvieron de la fase lútea de ratones hembra de la cepa CD-1 y son aisladas de la siguiente forma:

1. Se sacrificó el ratón por dislocación cervical, se separó el útero y se tomó parte del tejido de endometrio. Este se disgrega en trozos de menos de 1 mm de longitud.
2. La biopsia disgregada, se colocó en un tubo cónico con 10 ml de collagenasa tipo IA 0,1%.
3. El tubo se colocó de forma horizontal en un baño a 37°C, con una leve agitación durante 1 hora para llevar a cabo la digestión.
4. Se colocó el tubo en posición vertical durante 10 minutos.

5. Se recogió el sobrenadante (éstas son las células estromales), se lavó la pastilla que se formó (glándulas y células epiteliales) con 3-5 ml de DMEM y se dejó reposar 5 minutos. Se repitió esta acción tres veces.
6. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 4-5 ml de HSA 1 % en DMEM. Se recolecto y coloco la mezcla en un frasco de cultivo Falcon. Incubación durante 15 minutos a 37°C.
7. Se recuperó el sobrenadante del frasco y se pasó a otro frasco nuevo, se añadió 3ml de HSA 1% en DMEM. Se incubó este segundo frasco durante 15 minutos a 37°C
8. Se recogió todo el sobrenadante y se colocó en un tubo, se cuantificó el volumen.
9. Se preparó 700-800 µl de medio de cultivo de células epiteliales y añadió 200-300 µl de la suspensión celular obtenida y se cultivó en cajas petri tratadas.
10. Las células epiteliales son cultivadas aproximadamente durante 4-6 días, hasta confluencia del 80%.

6.3 Cultivo endometrial sin colagenasa

Las biopsias de las células epiteliales y estromales del endometrio se obtuvieron de la fase lútea de ratones hembra de la cepa CD-1 y fueron aisladas de la siguiente forma:

1. Se sacrificó el ratón por dislocación cervical, se localizó el útero y las trompas de Falopio y se extrajo todo completo. Se localizó el útero y se disgregó en trozos de menos de 1 mm de longitud.
2. La biopsia disgregada, se colocó en una caja Petri con medio DMEM adicionado.
3. Se incubó durante 24 hrs a 37°C en una atmosfera de aire y CO₂ al 5%.
4. Se observó al microscopio óptico sí las células se adhirieron al fondo de la caja petri y se empezaron a extender, para cambiar el medio, y ayudar a que se forme la monocapa.

5. Las células epiteliales fueron cultivadas de 4 a 6 días, hasta alcanzar una confluencia del 80%. La monocapa de las células epiteliales endometriales fue utilizada para llevar a cabo el proceso de la fertilización y el cocultivo de los embriones.

6.4 Obtención de ovocitos

Para la obtención de ovocitos en los días requeridos primero se indujo a la superovulación. Se requirieron de las hormonas: Gonadotropina Coriónica de Yegua Preñada (PMCG) y Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). Se administraron 5 UI de PMCG intraperitonealmente los días lunes, 48 hrs después se administraron 5 UI hCG los días miércoles y transcurridas 14 hrs de la última inyección se sacrificó el ratón hembra. Se extrajeron los ovocitos del asa, para ello el ámpula de cada asa fue desgarrado con un par de agujas bajo el microscopio estereoscópico, se recuperaron por medio de una pipeta y se colocaron en una caja Petri con medio TALP. Posteriormente, los ovocitos se incubaron a 37 °C en una atmósfera de aire y CO₂ al 5% durante 3 horas para que las células foliculares se expandieran y los ovocitos se estabilizaran y con ellos realizar una FIV sobre el cultivo de células epiteliales.

6.5 Obtención de espermatozoides.

Los machos fueron sacrificados por dislocación cervical, se retiró el epidídimo de los dos testículos y se hizo un corte a la altura de la cola del epidídimo para extraer los espermatozoides. Con una jeringa de insulina, se tomó medio TALP y se introduce muy cuidadosamente la aguja a la altura del conducto deferente, y se hizo pasar el medio por todo el conducto de tal manera que los espermatozoides descendan por el corte hecho en la cola del epidídimo. Los espermatozoides obtenidos se incubaron a 37 °C en una atmósfera de aire y CO₂ al 5% por 1 hora para atemperar y estabilizar los espermatozoides para posteriormente realizar la FIV.

6.6 Fertilización *In vitro*

Las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical para extraer los ovocitos que se encontraban en la asa. Los ovocitos obtenidos y maduros *in vitro* fueron recuperados utilizando una micropipeta de 10 µl bajo el microscopio estereoscópico y transferidos en medio CZB, en cuyo interior se cultivaron las células epiteliales endometriales. Posteriormente se agregan 50000 espermatozoides móviles obtenidos de la cola del epidídimo de machos adultos, que previamente fueron capacitados 1 h en medio TALP. Se cubrieron con aceite mineral estéril y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂, durante 20 horas.

Al mismo tiempo en cada experimento se realizaron fertilizaciones *in vitro* en ausencia de células endometriales.

6.7 Recuperación de embriones obtenidos por fertilización *in vitro*.

Después de cultivar los ovocitos en presencia de los espermatozoides en el cocultivo de células endometriales, se analizó la fertilización de los ovocitos: liberación del segundo cuerpo polar, formación de pronúcleos y el desarrollo embrionario temprano (segmentación).

6.8 Obtención de micrografías

Se tomaron microfotografías de todo el procedimiento con una cámara SCIENON modelo ISH500 (5.0 MP) a través del microscopio óptico modelo Nikon Eclipse TS 100 con el objetivo de 40x.

7. Resultados

Se realizaron 21 experimentos de fertilización *in vitro*, de los cuales 15 fueron exitosos. En cada uno se utilizaron 2 hembras y 1 macho, una hembra se utilizó para obtener el cultivo celular endometrial y la segunda para la obtención de ovocitos. El macho se utilizó para la obtención de espermatozoides para el proceso de fertilización. Para estandarizar la técnica del cultivo endometrial se realizaron un total de 11 experimentos.

La técnica para la obtención de cultivos endometriales fue estandarizada en el laboratorio, inicialmente se utilizó la enzima Colagenasa IA para separar las células que forman el útero, extraído del ratón y poder obtener las células epiteliales endometriales. Debido a que la colagenasa afecta a estas células (presencia de lisis, vacuolización y baja división celular) (Fig. 5A) se estableció no utilizar la enzima y realizar el cultivo directamente disgregando la biopsia del tejido uterino en menos de 1mm en cajas Petri con medio DMEM adicionado, las cuales se incubaron a 37°C en una atmósfera de aire y CO₂ al 5% durante 24 hrs, con lo que se logró que las células se adhirieran a la placa sin vacuolizarse (Fig. 5B).

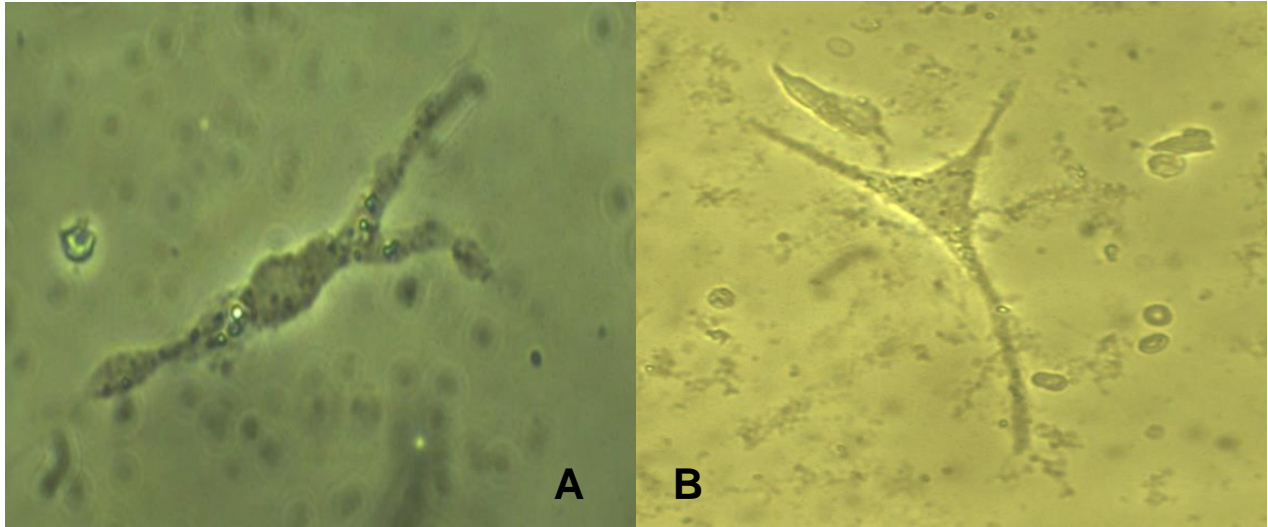


Fig. 5 Micrografía en microscopia de contraste de fases de células endometriales: **A)** Célula endometrial vacuolizada no adherida, **B)** Célula endometrial en cultivo extendida y adherida a la caja Petri. Aumento: 40x.

Las células endometriales en cultivo presentaron proliferación y características morfológicas normales (membrana plasmática bien definida, citoplasma claro, ausencia de vacuolas, emisión de prolongaciones citoplasmáticas, etc.), todos los cultivos celulares fueron realizados bajo el procedimiento mencionado y sobre ellos se llevaron a cabo todos los experimentos de fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario (Fig. 6).

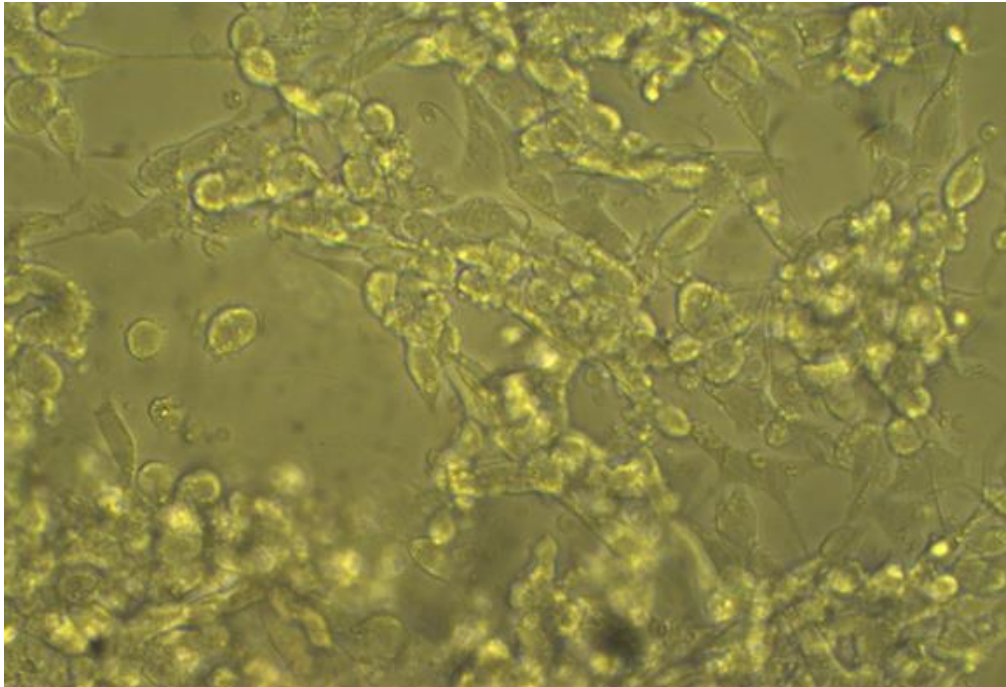


Fig. 6 Micrografía en microscopia en contraste de fases de Cultivo Endometrial. Se observa citoplasma claro, membrana plasmática bien definida, emisión de prolongaciones celulares, adherencia a la superficie de cultivo, etc. Aumento: 40x.

Por otra parte, la inducción hormonal de la ovulación en las hembras utilizadas permitió la obtención de ovocitos que fueron utilizados para realizar la fertilización *in vitro*. Se obtuvieron aproximadamente de 15 a 35 ovocitos por hembra. Los ovocitos recuperados presentaron células de cumulo, característica particular de los ovocitos ovulados (Fig. 7).

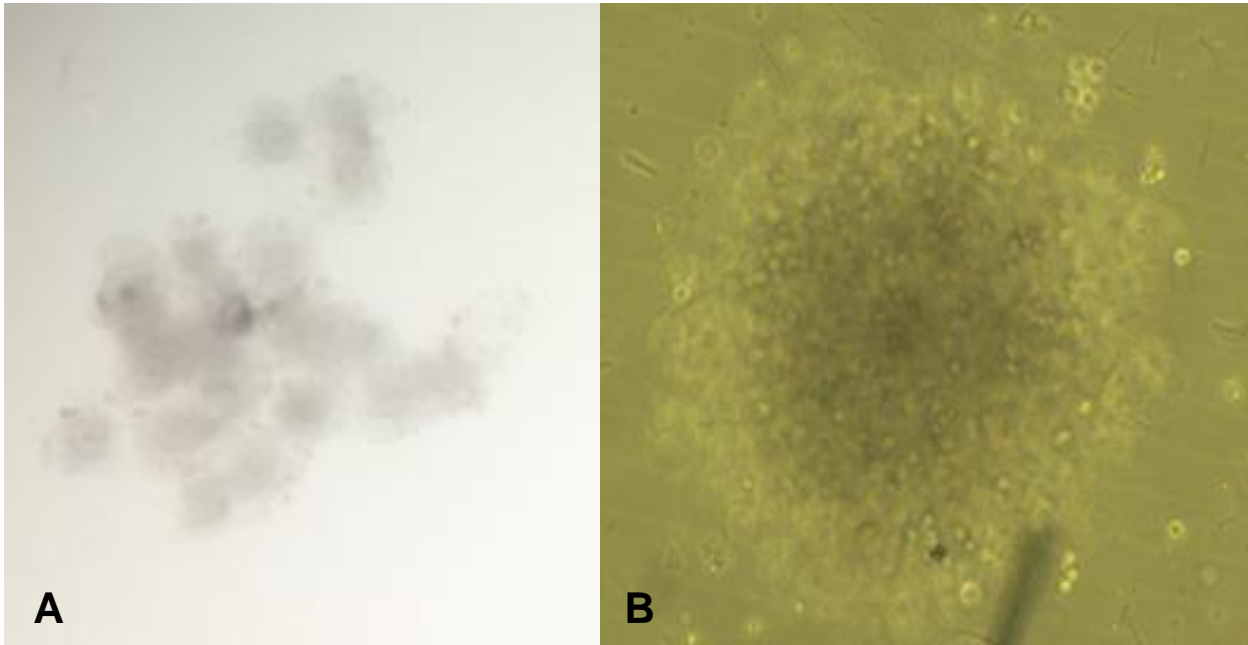


Fig. 7 Micrografía en contraste de fases de ovocitos recuperados de hembras a las que se les indujo superovulación: **A)** Grupo de ovocitos de ratón recuperados del asa después de la superovulación inducida hormonalmente, visto en 4x en Microscopio estereoscópico, **B)** Ovocito cubierto por el cúmulo de células de la granulosa, visto en Microscopio óptico. Aumento 40x.

Los ovocitos recuperados se incubaron durante 3 horas en medio TALP a 37° C para disgregar las células del cúmulo que los rodea y llevar a cabo la fertilización *in vitro* (Fig. 8).

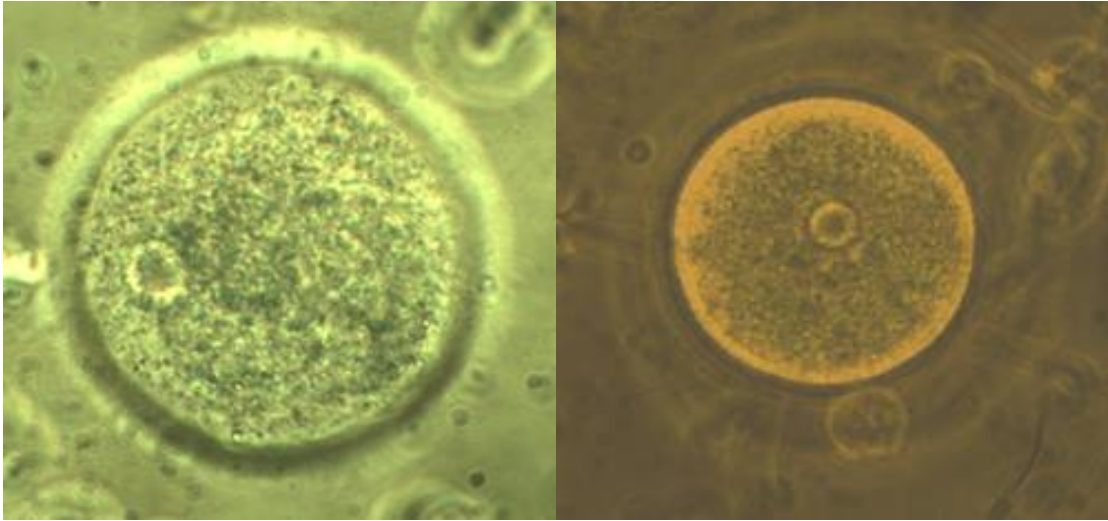


Fig. 8 Micrografía en microscopia en contraste de fases que muestra ovocitos de ratón maduro, se observa: primer pronúcleo, citoplasma homogéneo y transparente después de las 3 horas de incubación en medio TALP a 37° C en atmósfera de aire y CO₂ al 5%.Aumento 40x.

Por otro lado, los espermatozoides obtenidos del epidídimo del macho, se capacitaron en incubación durante 1 hora a una temperatura de 37° C, para posteriormente ser utilizados en la fertilización *in vitro* (Fig. 9).

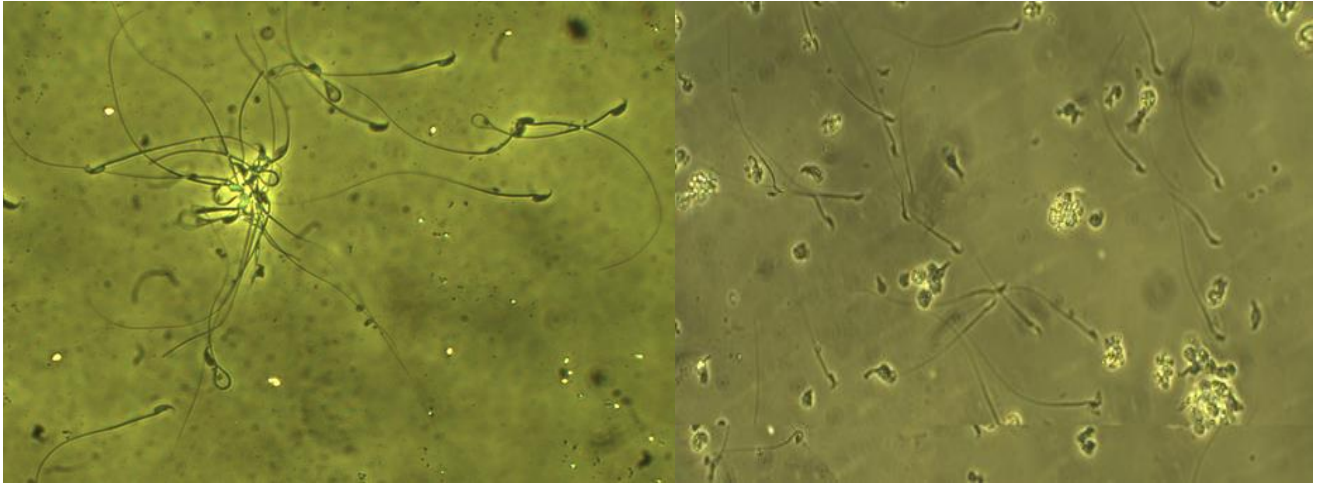


Fig. 9 Micrografía en microscopia en contraste de fases que muestra espermatozoides de ratón maduros después de 1 hora de incubación en medio TALP a 37° C en atmósfera de aire y CO₂ al 5%. Aumento:40x.

Todos los experimentos de fertilización *in vitro*, del grupo control se realizaron en ausencia del cultivo celular y del grupo experimental sobre el cultivo celular endometrial, en donde se depositaron los ovocitos y los espermatozoides, se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂ (Fig. 10).

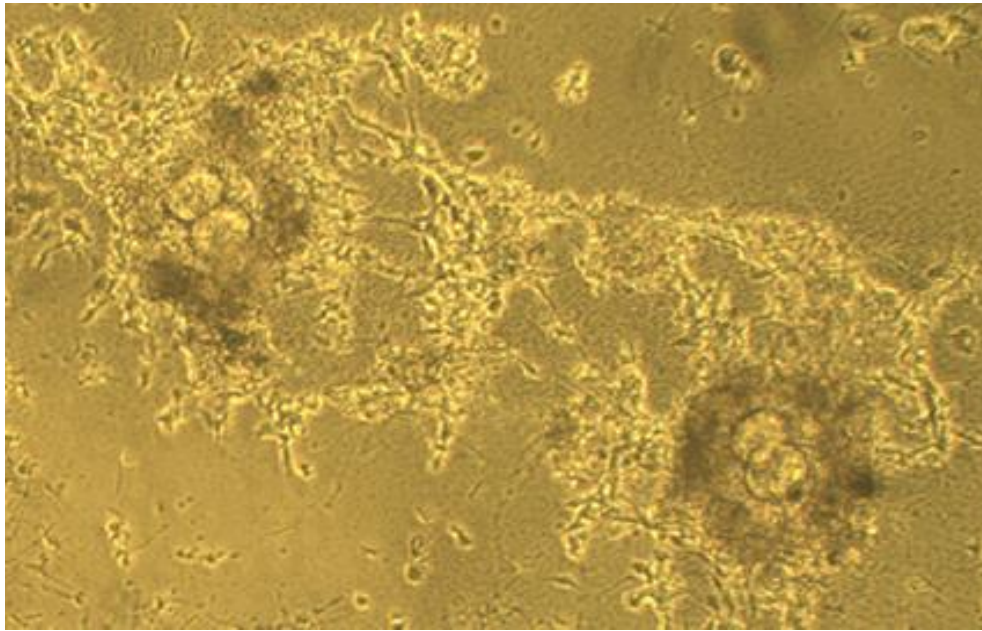


Fig.10 Micrografía en microscopia en contraste de fases de cocultivo endometrial en medio CZB de ovocitos fertilizados en etapa de 2 células después de 24 hrs de incubación a partir de la FIV. Con aumento 40x.

Sobre los cultivos celulares endometriales se realizaron un total de 21 experimentos de fertilización *in vitro* de los cuales 15 presentaban ovocitos fecundados, lo que representa el 54% de éxito. (Tabla 1). A la par se realizaron FIV con ausencia de cultivos celulares (control).

Tabla 1. Efecto del cocultivo de células endometriales sobre la fertilización *in vitro*.

	Ovocitos Fecundados mediante FIV (%)	Ovocitos cultivados (n=)	Ovocitos con presencia de pronúcleos y segundo cuerpo polar n= (%)
Cocultivo celular Endometrial	54%	272	148 (54.41)
Sin cultivo celular (control)	41%	320	131(40.93)

Tabla 1. Se representa el número total de ovocitos cultivados, el total de ovocitos fecundados con presencia de pronúcleos y segundo cuerpo polar después de 24 hrs de incubación, y el porcentaje de ovocitos fecundados con fertilización *in vitro* en presencia de cocultivo e ausencia de cultivo celular (control), que son viables para continuar su desarrollo embrionario.

7.1 Morfología de ovocitos fertilizados

Se observó el desarrollo del segundo cuerpo polar y pronúcleos en ovocitos fertilizados *in vitro* sobre cocultivo endometrial después de 20 horas de incubación a 37 °C en atmosfera húmeda al 5 % de CO₂. (Fig. 11). El desarrollo del segundo cuerpo polar indica la terminación de la meiosis II que es activada por la entrada del espermatozoide al citoplasma del ovulo.

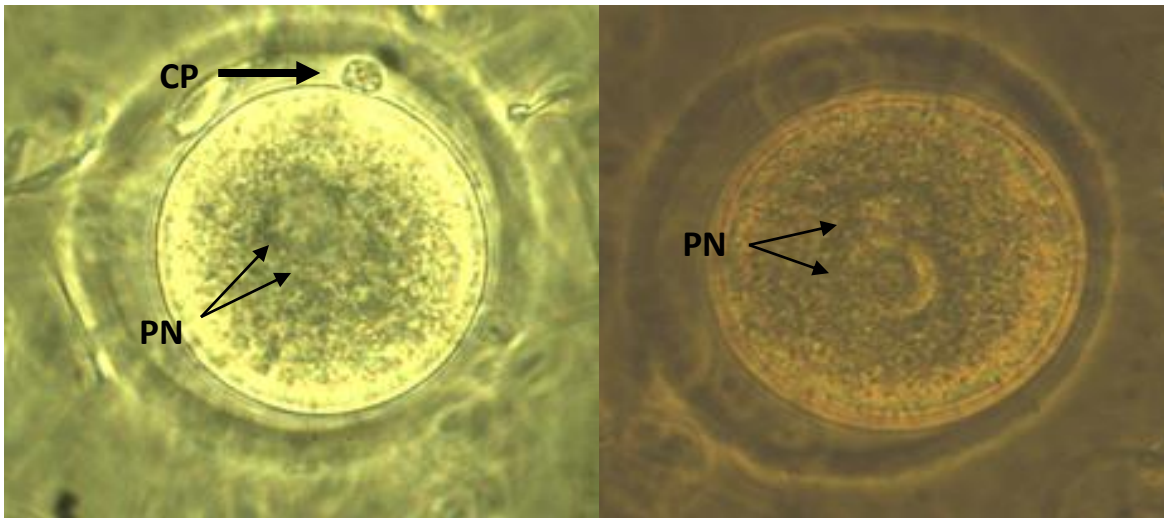


Fig. 11 Micrografía en microscopia en contraste de fases de ovocitos fertilizados con presencia de pronúcleos y segundo cuerpo polar (flecha) después de 20 hrs de incubación a 37°C en atmosfera húmeda al 5% de CO₂. Aumento 40x.

Se continuó con el desarrollo embrionario de los ovocitos con presencia de segundo cuerpo polar por otro estudiante, se observaron embriones de 2 células (Fig. 12A), 4 células (Fig. 13B), 8 células (Fig. 14C) y continuaron su crecimiento hasta etapa de mórula (Fig. 15D), presentaron características morfológicas normales (blastómeras simétricas, membrana plasmática bien delimitada y con tamaño uniforme; zona pelúcida intacta).

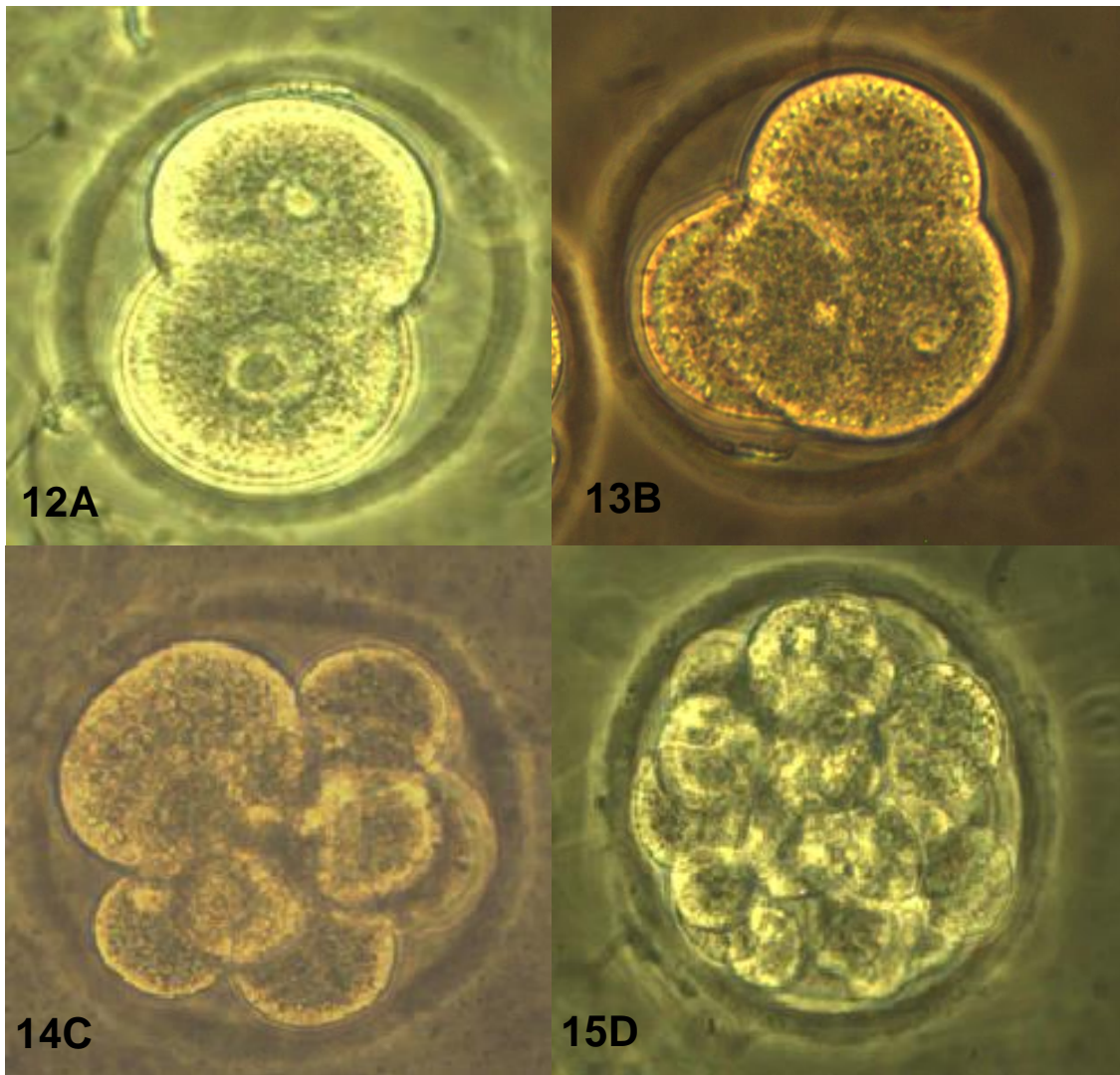


Fig. 12 .Micrografía en contraste de fases del desarrollo embrionario de ratón CD-1 en cocultivo de células endometriales: Fig.12A) embrión en etapa de 2 células, Fig.13B) embrión en etapa de 4 células, Fig.14C) embrión en etapa de 8 células, Fig.15C) embrión en etapa de mórula a 37° C en atmósfera de aire y CO₂ al 5%. Obtenidas en microscopio óptico. Aumento 40x.

8. Discusión

Estudios han reportado que en los procesos de fertilización *in vitro*, la producción embrionaria *in vitro* continua siendo un proceso ineficiente: debido a que sólo entre un 30% y un 40% de los ovocitos maduros logran alcanzar el estadio de blastocisto (Rizos y col, 2008), y un 28% (Gardner y col, 1998) y 44%(Jones, 1998) hasta la etapa de mórula.

En el presente trabajo se experimentó con cultivos celulares endometriales de ratón de la Cepa CD-1, donde se llevó a cabo el proceso de fertilización *in vitro*. El porcentaje de ovocitos fecundados sobre el cocultivo endometrial fue de 54%, este porcentaje se encuentra por encima de los estándares establecidos (30-40%) por las clínicas de reproducción asistida para procesos de fertilización *in vitro* (Lentz y cols, 2012). De acuerdo con Amparo y cols en 2003, los cocultivos han aumentado un 60% las tasas de desarrollo de blastocistos, en comparación de la utilización de medios convencionales.

Investigaciones proporcionan evidencia convincente de un diálogo químico entre el embrión en desarrollo y el endometrio materno (Edwards, 1995). Esta comunicación embrión-endometrio puede ser beneficiosa no sólo para aumentar la tasa de blastocistos, también para la activación de moléculas paracrinas específicas que de una manera oportuna pueden mejorar las posibilidades de implantación del embrión (Tazuke y Giudice, 1996).

También, se ha demostrado que un sistema de cocultivo con células epiteliales endometriales puede absorber factores tóxicos o inhibidores que afecten al desarrollo, presentes en el medio o producidos por el embrión, como las hipoxantinas (Romero y cols, 1998), también se les atribuye la liberación de factores embriotróficos o de factores de crecimiento importantes para el desarrollo normal del embrión (Gandilofi y cols, 1989; Satoch y col, 1994).

Hasta la fecha se han desarrollado varios sistemas de cocultivo basados en medios complejos, combinados con distintos tipos de células somáticas que han

permitido el desarrollo del embrión hasta el estadio de blastocisto (Rizos 2001, Mermillod y col, 2010).

Por lo que, el cocultivo embrionario con células epiteliales endometriales de ratón de la Cepa CD-1, suponen una alternativa viable para los procesos de reproducción asistida con repetidos fallos, ya que el presente trabajo ha demostrado aumentar la tasa de éxito de fecundación (54%) así como la calidad en el desarrollo embrionario.

Del sistema de cocultivo endometrial donde se llevó acabo la fertilización *in vitro* se obtuvieron embriones en diferentes etapas que presentaron morfología normal: blastómeras con citoplasma homogéneo sin fragmentación y membrana plasmática intacta, así como las características correspondientes a cada etapa, por lo que se consideran como embriones viables. Sin embargo, no podemos determinar a un 100% si el embrión es apto para implantación ya que un análisis morfológico no es suficiente para determinar esto.

Aunque se logró tener una tasa de éxito de fecundación alta (54%) algunos de los embriones, detuvieron su desarrollo embrionario, esto podría deberse a lo difícil que es manejar el microambiente en el que se encuentran los embriones, como lo menciona Lonergan en el 2006, el número de embriones en cultivo, la temperatura y el equilibrio de gases en la incubadora son factores decisivos que afectan tanto al desarrollo como la calidad embrionaria.

Una alternativa para llegar a etapa de blastocisto sería tener controles de calidad más estrictos, mantener factores como el pH, la temperatura y el CO₂ estables para evitar alteraciones en el ambiente de cultivo durante la fase post-fecundación e impedir que el desarrollo embrionario se detenga.

Con estos resultados podemos considerar necesario realizar más estudios del modelo de embriones sobre cocultivo epitelial endometrial que demuestren la comunicación embrionaria con el endometrio materno y que nos ayuden a entender mejor el proceso de implantación, así como describir todos los factores de crecimiento y cascadas de señalización que se activan con esta comunicación.

Todavía queda mucho camino por recorrer, se requieren más estudios sobre el efecto que tienen los fármacos utilizados en la inducción hormonal sobre la calidad de los ovocitos, el uso de cultivos celulares para el desarrollo embrionario que mejoren las técnicas de reproducción asistida así como la fertilización *in vitro*, y que nos permitan conseguir embriones en cultivo hasta etapa de blastocisto que cumplan los requerimientos de viabilidad necesarios para el proceso de implantación y con ello mejorar las tasas de éxito en estas técnicas, ofreciendo una mayor posibilidad de gestación en pacientes.

9. Conclusión

El cultivo de células endometriales favorece el proceso de la fertilización *in vitro* en ratones de la cepa CD-1.

10. Anexos

Fungizona

El vial contiene 250 µg/ml de Anfotericina B

1. Se rehidrató con 20 ml de agua de transferencia embrionaria. La concentración final recomendada se encuentra entre 0.25 y 2.5 µg/ml. Nuestra dilución de trabajo es de 0.5 µg/ml, por lo tanto añadimos 2 µl/ml de medio.

Gentamicina

El vial contiene 50 mg/ml. Nuestra concentración de trabajo fue de 100 µg/ml, por lo que añadimos 2 µl y 7ml de medio.

Insulina

La insulina proporciona un aumento de glucosa y de aminoácidos, tiene un efecto mitogénico. Es estable a 2-8 °C durante un año. La insulina soluble se encuentra disponible en el agua acidificada. La dilución de trabajo es de 5 µg/ml.

1. Para un vial del 100 mg, preparemos una solución stock de 10 mg/ml, y añadimos 10 ml de agua acidificada (pH <2.0) y 100 µl de ácido acético glacial.
2. Añadimos 0.5 µl/ml de la insulina preparada al medio, para que esté a la correcta concentración de trabajo.

Albumina Sérica Humana (HSA)

Este complemento se utilizó para promover la adhesión celular. La proteína se alícuota en tubos estériles, el volumen recomendado es de 40 ml. La proteína debe almacenarse a una temperatura de -20°C.

Medio DMEM

Este es el medio líquido que se utilizó para todo el procesado de la biopsia. Este medio está suplementado.

1. Para preparar un litro de medio, verter 300 mL de agua deionizada en un vaso de precipitados de 1 L, posteriormente llevar acabo las mediciones que se enlistan a continuación:

Sustancia	Cantidad
DMEM	13.37g
L- arginina HCl	0.116g
L- asparagina anhidro	0.036g
NaHCO ₃	2.0g
HEPES	2.38g
β- mercaptoetanol	3.5μL
Piruvato de sodio	100 mL (100 mM)
L- glutamina	7.5 ml (200 mM)
Pencilina	1.0 ml (1000 X)

MEDIO TALP (Betancourt y col., 1993)

Utilizado para el lavado de ovocitos y disolventes de enzimas.

COMPONENTE	Concentración final [mM]	Mg/50 ml
NaCl	114	33
KCL	3.2	12.8
NaHCO ₃	25	105.2
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0.4	2.8
Lactato de Na	10	0.071 ml
Rojo Fenol	_____	0.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.0	15
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5	5

Aforar a 50 ml con agua destilada.

1.- Adicionar $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al final.

2.- Ajustar pH a 7.4 con HCl o NaOH.

3.- Ajustar osmolaridad a 280- 300 mOsm/kg con NaCl.

4.- Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 μm .

Medio CZB (Chatot, Ziomek, Bavister médium)

Medio para cultivo de embriones de ratones

Compuesto	Concentración final [mM]	PM	mg/Lt
NaCl	81.6	58.44	4768.7
KCl	4.8	74.56	357.87
KH_2PO_4	1.2	246.48	295.77
CaCl_2	1.7	147.02	250.00
MgSO_4	1.2	136.09	163.30
EDTA	0.1	380.2	38.02
Lactato de sodio	31.0	112.06	3473.86
Gentamicina	5.6	198.17	1109.75
NaHCO_3	25.0	84.01	2100.25
Piruvato de sodio	0.3	110.05	33.01
L-glutamina	1	146.15	146.15
DPBS	10 $\mu\text{g/ml}$ (0.5%) en Dulbecco's phosphate buffered saline.		
Rojo de fenol	1 mg/ml		1,000.00

pH 7.4, preparar con agua doble destilada, filtrar en 0.22 μm

Medio MCDB-105

Medio básico que favorece el crecimiento celular.

Se preparó con agua de transferencia embrionaria como se describe a continuación y se guardó en la oscuridad de 2-8 °C hasta su uso. No más de una semana.

1. Calcular el 90% del volumen final con agua de transferencia embrionaria.
2. Añadir al medio MCDB-105, disolver y no calentar. El medio virará a color amarillo.
3. Enjuagar el envase original con una pequeña cantidad de agua para eliminar todos los restos de polvo.
4. Ajustar el pH del medio. El pH final estará a 7.4. podemos ajustar el pH a 7.2, ya que a 37°C el pH incrementa a 0.1-0.3 unidades. Al añadir 4-5ml de NaOH 1M vamos midiendo el pH hasta tener la medición deseada, pH=7.4.
5. Aforamos con agua a la solución hasta el volumen final.
6. Esterilizamos inmediatamente por filtración usando una membrana con una porosidad de 0.22 µm.

Ingredientes	mg/ L
Sales inorgánicas	
Metavanadato de amonio	0.000585
Cloruro de calcio (anhídrido)	147.000
Sulfato cúprico 5H ₂ O	0.00025
Sulfato ferroso 7H ₂ O	1.390
Sulfato de magnesio (anhídrido)	120.380
Sulfato de manganeso	0.000151
Ácido molíbdico de amonio (anhídrido)	0.00124
Cloruro de níquel 6H ₂ O	0.00012
Fosfato de potasio monobásico (anhídrido)	408.270
Cloruro de sodio	6546.000
Metasilicato de sodio 9H ₂ O	0.1421
Selenita de sodio	0.0052
Cloruro de estaño 2H ₂ O	0.000113
Sulfato de zinc 7H ₂ O	0.144
Aminoácidos	
Glicina	7.510

L-Alanina	8.910
L-Arginina HCl	210.700
L-Asparagina H ₂ O	15.000
L-Ácido aspártico	13.310
L-Cisteina HCl H ₂ O	8.780
L-Ácido glutámico	14.710
L-Glutamina	365.300
L-Histidina HCl H ₂ O	20.970
L-Isoleucina	3.940
L-Leucina	13.120
L-Lisina HCl	36.540
L-Metionina	4.480
L-Fenilalanina	4.960
L-Prolina	34.530
L-Serina	10.510
L-Treonina	11.910
L-Triptófano	2.040
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	7.840
L-Valina	11.720
Vitaminas	
Cloruro de colina	13.960
D-Biotina	0.007339
D-Ca-pantoténico	0.238
Ácido Fólico (Calcio)	0.000512
Niacinamida	6.110
Piridoxina HCl	0.0617
Riboflavina	0.113
Tiamina HCl	0.337
Vitamina B12	0.136
mio-Inositol	18.020
Otros	
Adenina HCl	1.720
D-Glucosa	720.640
HEPES	5958.000
Ácido linoleico	0.0028
Rojo fenol Na	1.242
Putrescina 2Na	0.000161
Ácido pirúvico Na	110.000
Ácido tióctico	0.00206
Timidina	0.0727

11. Bibliografía

- Amparo M, Juan GV, Ernesto E, Jose R, Antonio P, Carlos S. (2003). Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells:a 5 year follow-up study. *Fertil Steril*. 80: 1162-1168.
- Aoyagui Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa Y, Minegishi M, Ono H. (1990). Effects of culture systems on development of in-vitro fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*. 34: 749-759.
- Aoyagui Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa Y, Minegishi M, Ono H. (1989). Effects of culture system on development of in-vitro fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*. 31: 168.
- Austin CR, Short RV. (1982). Las células germinales y la fertilización. La Prensa Médica Mexicana, S.A: México.
- Banks WJ. (1981). Female reproductive system. Estados Unidos: Waverly Press Inc, Chapter 24,pp 494-516.
- Barros C, Leal J. (1982). In vitro fertilization and its use to study gamete interactions. Lancaster, England MTP Press. pp.37-49.
- Berg U, Reichenbach HD. (2004). Producción in vitro de Embriones. *Biología de la Reproducción* (www.reprobiotec.com). pp 120-139.
- Betancourt M, Fierro R, Ambriz D. (1993). In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology*.40:155-160.
- Biggers JD, Gwatkin RBL, Brinster RL. (1962). Development of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature*.194:747-9
- Boland MP. (1984). Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*. 21: 126-137.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod*. 27: 147-158.
- Cooke PS, Buchanan DL ,Young P, Setiawan T, Brody J ,Korach KS.(1997).Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects estradiol on uterine epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci*.94: 6535-6540
- Cox JF, Saravia F, Briones M, María AS. (1995). Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology*.44: 451-460.
- Crister ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL, First NL.(1986). Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology*. 25: 150.

- Dalia A, Ojeda N. (2008). Fertilidad y Reproducción Asistida. (1ª ed.). Caracas: Editorial Medica Panamericana. Cap.54:587-592.
- Domínguez F, Yanez-Mo M, Sánchez-Madrid F, Simón C. (2005). Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players. *FASEB J.* 19:1056-1060
- Dorado M, Marqués de Oliveira N, Lorenzo C, Vázquez G, Marco Y. (2006). Evolución de los medios de cultivo embrionario en Técnicas de Reproducción Asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 23:31-36
- Engel HJL, Berger GS, Dingieelder JK. (1984). Use of the hamster zona-free OVUM test in human in vitro fertilization program. *Theriogenology.* 7: 105.
- Epel, D. (1977), Proceso de la fecundación. *Science American* 237: 63-72.
- Eyestone WH, Leibfriend-Rutledge ML, Northey DL, GilliganBG, First NL. (1987). Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology.* 28: 1-7.
- Fukui Y, Ono H. (1988). In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.* 122:282.
- Gadea MJ. (2001). La Evaluación de la Capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro. *Invest. Agr. Prod. Sanid. Admi.* 16: 63-78.
- Gandolfi F, Moor RM. (1987) Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil Steril.* 81:23-28
- Gardner DK., Lane M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum. Reprod.* 3:148–159.
- Glew AM, Fukui Y, Gandolfi F, Moor RM. (1988). In vitro culture of sheep oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology.* 29:287
- Goldberg JM. (2007). In vitro fertilization update. *Cleve Clin J Med.* 74: 329-38.
- Greve T, Madison V. (1991) In vitro fertilization in cattle: a review. *Reprod Nutr Dev.* 31: 147-157.
- Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, Fuente J. (2001). Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 55: 1117–1126.
- Hanada A, Chang MC. (1976). Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. *J. Reprod. Fert.* 46:239-241.
- Hanada A, Chang MC. (1978). Penetration of the zona-free or intact eggs by foreign spermatozoa and the fertilization of deer mouse eggs in vitro. *J. Exp. Zool.*, 203:277-286.

- Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S, Garnier V. (1987). In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*.27: 59-68.
- Ishihara K, Araki T. (2003). Determination of blastocyst implantation site in spontaneous pregnancies using three-dimensional transvaginal ultrasound. *J Nippon Med Sch*. 70:250-400.
- Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. (1998). Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum. Reprod*. 13:169-177.
- Juan LG, Paulo S, Antonia H, David O. (1999). Cultivo y transferencia de blastocisto ¿la respuesta?. *Rev Colomb Obstet. Ginecol*.50: 89-94.
- Labadía A. (1995). Bases fisiológicas de la Reproducción en la hembra. En: García A, Castejón F, de la Cruz LF, González J, Murillo MD y Salido G , *Fisiología Veterinaria*, Mc Graw-Hill•Interamericana de España, Madrid, pp 840-860.
- Leese BA. (2000).The role of the endometrium during embryo implantation.*Hum Reprod*. 6:39-50
- Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM, Katz VL. (2012). *Comprehensive Gynecology*. (6th ed). Philadelphia: Editorial Elsevier Mosby. Cap 41.
- Lu KH, Gordon I , McGovern H, Gallagher M.(1988). Production of cattle embryos by in vitro maturation and fertilization of follicular oocytes and their subsequent culture in vivo in sheep. *Theriogenology*. 29: 272.
- Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M, McGovern H. (1988). Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. *Vet. Rec*. 122: 539-540.
- Palma GA, 1991. Fecundación in vitro. En: Curso de producción in vitro y clonado de embriones bovinos, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. 29:1-18.
- Palma GA, Clement-Sengewald A, Berg U, Brem G.(1992). Role of the number in the development of in-vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. 37: 271.
- Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. (2002). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol. Reprod. Dev*. 62: 320–327
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-García R, Pintado B, Fuente J, Gutiérrez-Adán A. (2002). Analysis of differential Messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* 66:589-95.

- Romero L, Figueroa MJ, Velarde P, Gonzalez A. (1998). Las técnicas de cocultivo versus medios secuenciales: La búsqueda de un método sencillo para su uso rutinario. *Asebir*. 3: 25-26.
- Simón C, Horcajadas J, García-Velasco J. (2009). *El Endometrio Humano: desde la investigación hasta la clínica*. (6ª ed.).Madrid: Editorial Panamericana Medica. pp164-172.
- Simón C, Mercader A, García-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. (1999) Coculture of Human Embryos with Autologous Human Endometrial Epithelial Cells in Patients with Implantation Failure. *J Endocrinol Metabol*. 84:2638-2646.
- Simón C, Valbuena D, Martín J, Mercader A, Garrido N, Rossal LP.(2002). *Reproducción Humana: La implantación embrionaria*. (2a ed). Madrid. Editorial Interamericana de España. pp 421-429.
- Sirard MA, Lambert RD, Menard DP, Bedoya M. (1989). Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in the rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus.*J. Reprod. Fert*.75: 551-556.
- Slavík T, Fulka J. (1992).In vitro fertilization of intact sheep and cattle oocytes with goat spermatozoa. *Theriogenology*. 38: 721-726.
- Slavík T, Pavlok A, Fulka J. (1990).Penetration of intact bovine ova with ram sperm in vitro. *Mol Reprod Dev*. 25: 345-7.
- Tyler JPP, Pryor JP, Collins WP. (1981).Heterologous ovum penetration by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*. 63:499-508.
- Urbina T, Lerner J. (2008).*Fertilidad y Reproducción Asistida*.(1ª ed.).Caracas: Editorial Medica Panamericana.Cap7:119-122
- Urbina T, Lerner J. (2008).*Fertilidad y Reproducción Asistida*.(1ª ed.).Caracas: Editorial Medica Panamericana. Cap 8: 125-130
- Urbina T, Lerner J. (2008).*Fertilidad y Reproducción Asistida*.(1ª ed.).Caracas: Editorial Medica Panamericana. Cap 46: 490-508.
- Valles CS, Domínguez F. (2006). Embryo-endometrial interaction. *Chang Gung Med J*. 29:9-14.
- Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. (1991).Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril* .79:577-584.
- Wassermann PM. (1989). La fecundación en los mamíferos. *Investigación y Ciencia*.149:48-55.
- Xu KP, Greve T, Callense H, Hyttel P. (1987). Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert*. 81: 501-504.
- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. (1976). The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod*. 15: 471-476.

- Yanagimachi R. (1964). Behaviour of hamster sperm to the hamster and mouse ovain vitro. In proceedings of the 5lh International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Trento.7:292-293.
- Yanagimachi R. (1972). Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs invitro. J. Reprod. Fert. 28:477-480.
- Yanagimachi R.(1984). Fertilization in mammals. Tokai J Exp Clin Med. 9: 81-5.