

**Eficiencia en la transferencia de embriones frescos de la raza Nelore  
en la Hacienda Real Wood, Planeta rica, Córdoba.**

**Trabajo de grado para optar por el título de Médica Veterinario**

**Por:**

**María Camila Rios Lora**

**Asesor**

**Jhonny Alberto Buitrago Mejía. MV,Z, Esp, MSc**

**Unilasallista Corporación Universitaria**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Medicina Veterinaria**

**Caldas-Antioquia**

**2022**

## Tabla de contenido

Resumen .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Introducción .....	7
Objetivos.....	9
Objetivo general .....	9
Objetivos específicos.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Justificación. ....	10
Marco teórico .....	12
Biotecnología de la reproducción .....	12
Ciclo estral.....	12
Estro.....	13
Metaestro .....	13
Diestro.....	13
Proestro.....	14
Dinámica folicular .....	14
Transferencia de embriones.....	16
Ganadería en Colombia .....	17
Técnicas para la obtención de embriones .....	19
Embriones in vivo.....	19
Embriones in vitro.....	20
Aspiración folicular .....	21
Fertilización in vitro.....	23
Clasificación de embriones.....	25
Calidad embrionaria .....	28
Criopreservación de embriones.....	28

Refrigeración.....	28
Congelado convencional.....	29
Vitrificación.....	29
Soluciones crioprotectoras.....	29
Selección de receptoras.....	31
Procedimiento de transferencia de embriones.....	31
Materiales y métodos.....	33
Ubicación del estudio.....	33
Descripción de la población de estudio.....	33
Donadoras.....	33
Receptoras.....	33
Obtención de embriones.....	33
Obtención de oocitos:.....	33
Fertilización in vitro.....	34
Transferencia de embriones.....	34
Análisis estadístico.....	35
Resultados.....	36
Discusión.....	39
Conclusiones.....	41
Referencias.....	42

## Tabla de ilustraciones

Ilustración 1: Dinámica hormonal y folicular durante el ciclo estral de la vaca (Rippe, 2009).....	14
Ilustración 2 Imagen microscópica de la clasificación de oocitos en la técnica OPU (Filipiak & Larroca, 2010).....	22
Ilustración 3 Estadios del desarrollo embrionario (Filipiak & Larocca, 2012). .....	27

## Lista de tablas

Tabla 1 Código de clasificación de los embriones .....	26
Tabla 2 Cantidad de oocitos recuperados mediante OPU y clasificación según su calidad en 11 donadoras nelore.....	36
Tabla 3 Total de embriones obtenidos median FIV y clasificación por calidad de 11 donadoras nelore. ....	37
Tabla 4 Tasa de gestación y Perdida embrionaria a los 30 y 90 días, en un protocolo de transferencia de embriones. ....	38

## Resumen

La transferencia de embriones es una biotecnología que permite producir animales de alto valor genético en menor tiempo. En nuestro país la utilización de estos métodos ha sido importante y tomando gran relevancia desde los últimos 10 años, fortaleciendo y mejorando los protocolos que se aplican en este, obteniendo mayor ganancia e incentivando la técnica en nuestro país.

Este estudio reportará la de tasa de preñez obtenida por transferencia de embriones en base de 11 donantes de raza Nelore y 45 receptoras entre varios cruces cebuinos con Guzerat, entre otros. se aspiraron las donadoras, se obtienen los oocitos y se procede a realizar fertilización in vitro, este proceso tarda 7 días, de ahí es posible determinar el clivaje y la producción de embriones obtenidos. La tasa de implantación de estos embriones y el tiempo estimado se da por medio de ayudas imagenológicas como ecografía y/o palpación rectal, se realiza a los 30 días Dx1 (primera entrega) y se repite a los 90 días para garantizar preñez Dx3 y evidenciar las pérdidas embrionarias (segunda entrega y confirmación de preñez).

Este trabajo es uno de los pocos reportes realizados en Colombia, y aporta al uso de biotecnologías reproductivas en las condiciones de trópico bajo. Los resultados obtenidos permiten considerar los protocolos OPU-FIV como una opción para el mejoramiento de la ganadería bovina.

**Palabras claves:** Transferencia de embriones, biotecnología, genética, fertilización in vitro, ganadería.

## Introducción

Las biotecnologías de la reproducción son todas aquellas técnicas que se realizan para aumentar la eficiencia reproductiva de los animales, dentro de estas se encuentran la inseminación artificial, transferencia de embriones, clonación, producción de embriones in vivo e in vitro, entre otras. La transferencia de embriones es una herramienta para el mejoramiento genético del ganado y tiene como objetivo incrementar la tasa reproductiva de hembras sobresalientes en líneas específicas de la reproducción y se realiza desde finales del siglo XIX (1890) (Fao, s.f.). Este proceso se realiza in vivo con superovulación o in vitro en laboratorio, para ser transferido a una receptora que lleve a término la gestación (Guerra, Solis, Sandoya, & de Armas, 2012).

Para la obtención de los embriones se requieren varios procesos, el primero es la obtención de los ovocitos mediante la aspiración folicular guiada por ultrasonografía, los ovocitos inmaduros son recolectados, se seleccionan y clasifican, seguida está la maduración, fertilización in vitro, cultivo y luego la transferencia mediante pajillas, para su implantación y desarrollo en los momentos adecuados (Lopez R. , 2019).

En Colombia, la transferencia de embriones se ha utilizado como herramienta de mejoramiento durante los últimos 20 años, y desde hace 10 se inició la producción comercial a través de técnicas in vitro (FIV). El uso de la transferencia de embriones ha posicionado a Colombia como productor de ganado,

especialmente de la raza Brahman, debido a la aceleración en el mejoramiento genético (Oyuela & Jimenez, 2010).

Este trabajo pretende describir la eficiencia de transferencia de embriones en base a la tasa de implantación a los 30 días con embriones frescos obtenidos mediante fertilización in vitro y la pérdida embrionaria a los 90 días con embriones frescos obtenidos mediante fertilización in vitro en condiciones de trópico bajo en Colombia.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

- Evaluar la tasa de implantación y gestación a distintas edades gestacionales con embriones frescos de la raza Nelore obtenidos mediante fertilización in vitro en la hacienda real Wood.

### **Objetivos específicos**

- Establecer la tasa de implantación a los 30 días con embriones frescos de la raza Nelore obtenidos mediante fertilización in vitro en la hacienda real Wood.

- Determinar la pérdida embrionaria a los 90 días con embriones frescos de la raza Nelore obtenidos mediante fertilización in vitro en la hacienda real Wood.

## Justificación

Durante los últimos años, la implementación de nuevas tecnologías en especial las de reproducción animal, han tenido gran importancia para el sector pecuario a nivel mundial. Una de las tecnologías por destacar, la transferencia de embriones que ha sido utilizado para producir y mejorar el impacto de animales de alta genética y disminuir el intervalo reproductivo en los sistemas ganaderos (Pacheco, Maldonado, Sierra, Lancheros, & Porras, 2018).

En la actualidad la transferencia de embriones es utilizada alrededor del todo mundo y se transfieren más de 500.000 embriones por año (Thibier, 2001). Esta biotecnología reproductiva aumenta el número de descendencia obtenida de donantes de alto valor genético y es utilizada para estandarizar la genética deseable en todo el mundo (Gonzales & Mauricio, 2005).

De los datos recientes publicados por la international embryo technology society demuestran que, en los últimos 20 años, la producción de embriones in vitro a diferencia de su homólogo in vivo ha tenido un crecimiento exponencial de un 400% aproximadamente, llegando a registrar en el 2018 más de un millón de embriones bovinos producidos in vitro (IETS , 2020).

En Colombia como en el resto del mundo, el sector agropecuario ha crecido de manera acelerada obligando a los productores a ser más competentes, lo que los lleva a la búsqueda de nuevas alternativas para suplir las necesidades de un

país, dichas alternativas ayudan a mejorar la producción y en este caso mejorar la eficiencia reproductiva. Es de gran importancia generar conocimiento sobre las biotecnologías reproductivas como la transferencia de embriones, que tiene como objetivo aumentar la producción de un hato para suplir la demanda de mayor cantidad y calidad de carne y leche, al mismo tiempo que aportan al mejoramiento genético (Bonilla, Bonilla, & Gomez, Producción de embriones bovinos del laboratorio invitro colombia durante el año 2019, 2021).

En Colombia no se tiene conocimiento de datos de producción constantes ya que los laboratorios comerciales no publican sus resultados, evitando un posicionamiento del país en el mapa mundial de la biotecnología reproductiva aplicada a la producción comercial (Bonilla, Bonilla, & Guillermo, Produccion de embriones bovinos de laboratorio in vitro en Colombia duranteel año 2019, 2021).

## **Marco teórico**

### **Biotecnología de la reproducción**

La biotecnología de la reproducción comprende a las técnicas como: inseminación artificial (IA), clonación, transferencia de embriones, producción de embriones in vivo e in vitro , que permiten aumentar la eficiencia reproductiva y las tasas de mejoramiento genético de las poblaciones animales, contribuyendo de esta forma a desarrollar la producción del sector ganadero, incrementando favorablemente la multiplicación y transporte de material genético y facilitando el almacenaje de recursos genéticos únicos para su posible utilización futura (Palma G. A., 2008).

Las biotecnologías reproductivas han evolucionado desde 1908 con el desarrollo de la inseminación artificial, continuando en 1970 con el control hormonal y la transferencia de embriones, posteriormente en 1980 se desarrolla el sexado de embriones y la producción in vitro de embriones, evolucionando en 1990 a la clonación celular y finalmente con la transgénesis en el 2000. Es importante resaltar que las biotecnologías reproductivas no alteran el genoma (Ugalde, 2014) .

### **Ciclo estral**

El ciclo estral es definido como el periodo de tiempo que transcurre entre dos celos y en los bovinos tiene una duración promedio de 21 días, con un rango de 17 a 24 días. Durante el ciclo estral los ovarios sufren una serie de cambios morfo fisiológicos que finalizan con la ovulación y la expulsión de ovocitos capacitados para ser fecundados, estos cambios están regulados por hormonas procedentes de distintos órganos (hipotálamo, hipófisis, ovario y útero) (Rippe, 2009). Para su

comprensión el ciclo estral se ha dividido en distintas fases, que para el caso del bovino comprenden estro, metaestro, diestro y proestro (Guaqueta, 2009).

### ***Estro***

En esta fase la hembra es receptiva, se deja montar de otras vacas y en sistemas de monta natural acepta la copula, en esta fase hay un aumento de las concentraciones de estradiol producido por el folículo preovulatorio. Su duración es de 8-12horas (Hernandez Calderon, 2016).

### ***Metaestro***

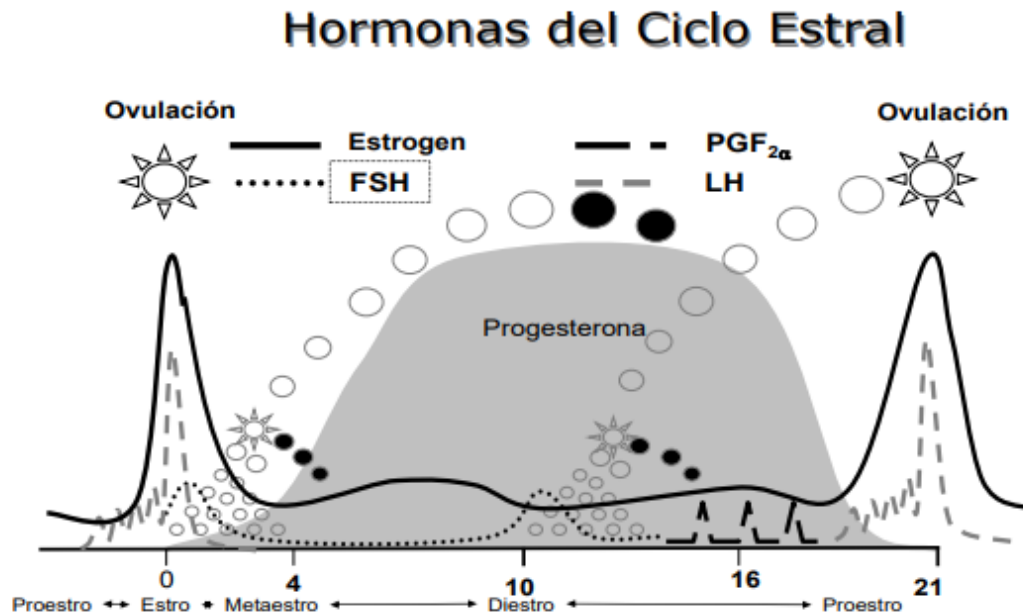
Esta fase se da Inmediatamente después del estro y tiene una duración de 3 a 5 días. Durante esta fase ocurre la ovulación, que tiene lugar entre 28 a 32 horas después iniciado el estro. Después de la ovulación el antro folicular se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico, la cual mediante el proceso de luteinización de las células foliculares se transformará en cuerpo lúteo. que es el encargado de mantener la gestación mediante la producción de progesterona (Sarmiento & Naulaguari, 2019).

### ***Diestro***

Esta fase se da una vez formado el cuerpo lúteo y tiene una duración 12 a 14 días, esta se considera que tiene inicio una vez que se observan concentraciones significativas de progesterona en la sangre. Esta fase finaliza con la lisis del cuerpo lúteo si no se da la fecundación (Fundacion Chile, 2008).

### **Proestro**

se caracteriza por la ausencia de un cuerpo lúteo y el desarrollo y maduración de folículos ováricos, tiene una duración de 2-3 días. Un evento hormonal característico de esta etapa es el incremento de la frecuencia de los pulsos de secreción de LH que conducen a la maduración final del folículo ovulatorio y al incremento de estradiol sérico, lo que desencadena el estro (Hernandez Calderon, 2016).



**Ilustración 1: Dinámica hormonal y folicular durante el ciclo estral de la vaca (Rippe, 2009).**

### **Dinámica folicular**

Se conoce como dinámica folicular el proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio, como resultado obtener la ovulación. En vacas, este proceso se lleva a cabo mediante

ondas, típicamente se producen 2 o 3 ondas de desarrollo folicular. En vaquillonas y durante el post parto precoz de vacas multíparas parecen más frecuentes los ciclos ováricos con 2 ondas, mientras que vacas adultas presentan habitualmente ciclos de 3 onda entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular ocurren en el ciclo estral, y el folículo preovulatorio deriva de la última (Motta, Ramos, Gonzalez, & Castro, 2011).

Para describir la dinámica folicular bovina es necesario definir conceptos de reclutamiento, selección y dominancia:

- Reclutamiento: un conjunto de folículos tempranos (2-3mm) son seleccionados para crecer a partir del aumento de la hormona FSH que se produce en la adenohipófisis. El punto máximo de FSH sucede luego de que el folículo alcance un tamaño de 4 mm y crece por ser el más receptivo a la FSH (Henao & Trujillo, 2000).
- Selección: es un proceso por el cual un único folículo es dominante y evita la atresia ya que tiene un crecimiento constante, los otros folículos subordinados se someten a atresia, se da por la disminución de FSH y la síntesis de inhibina por el folículo dominante sobre los demás. el folículo dominante tiene más receptores de LH en las células de la teca lo que le da una ventaja sobre aquellos folículos que su finalidad es convertirse en subordinados (Valencia, Sanchez, & Baldrich, 2017).
- Dominancia: proceso en el cual el folículo dominante ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de un nuevo conjunto de folículos.

Este efecto persiste hasta la atresia de los demás folículos o porque el folículo dominante es ovulado. Dicho folículo adquiere la capacidad de crecer continuamente aun en presencia de otras hormonas que crean un medio no apto para los demás folículos, cuando se da la ovulación del folículo dominante se produce un aumento de FSH y así dando lugar a una nueva onda folicular (Sintex, 2005).

### **Transferencia de embriones**

La transferencia de embriones es una biotecnología que consiste en coleccionar embriones de una hembra donante y transferirlos a otra una hembra receptora, con el fin de llevar una gestación a término (Pasa, 2008).

Esta técnica puede ser utilizada para acelerar el progreso genético, aprovechar el potencial de hembras de alta genética, control de enfermedades, acortar el intervalo generacional, conservación de especies en extinción, formación de nuevas razas con pocos donantes, producir gemelos, cuatrillizos (micro manipulación), controlar el sexo de las crías, obtener crías con mayor posibilidades de supervivencia y adaptación, mantener embriones por largo tiempo (conservación), fomentar las ciencias reproductivas entre otras (Bedoya, 1994).

La historia de la transferencia de embriones inicia a finales del siglo XIX (1890) con el Dr. Walter Heape, en Inglaterra, quien logra obtener una camada de conejos; con ella dando inicio a la técnica de transferencia embrionaria, esta técnica se llevó a cabo realizando una incisión en la cavidad abdominal por el cual se logró exponer e intervenir el aparato reproductivo de la hembra. Luego de ser descrita la técnica de transferencia de embriones, fue aplicada al resto de las especies

domésticas. En la década de 1950, la técnica de la transferencia de embriones bovinos dio un gran paso al efectuarse la primera por Umbaugh, la cual fue seguida por el primer nacimiento de un ternero mediante un esfuerzo combinado del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la Universidad de Wisconsin (Alvaro Diaz, 2007).

En bovinos, la transferencia de embriones a través del cérvix comenzó a ser utilizada en trabajos experimentales en 1949. Hubo dificultades de distinta índole que se presentaron en el desarrollo del método, hicieron que el nacimiento del primer ternero se produjera recién en 1964 (Cutini, Tereul, & Cabodevilla, 2000).

Desde hace 57 años se viene desarrollando la transferencia de embriones (TE), técnica conducente a mejorar las características deseables de un hato ganadero, ya que, a través del aumento del número de embriones el potencial genético de la hembra puede emplearse con más eficiencia, lo cual facilita la implementación de programas de mejoramiento genético (Palma G. A., 2008; Palma & Gottfried, 2001).

### **Ganadería en Colombia**

Para la ganadería colombiana esta biotecnología puede constituirse en una fuente fundamental de aprovechamiento de la genética de nuestras hembras bovinas, en las cuales se encuentren características como adaptación, rusticidad, productividad en características deseables y reproducción eficiente, de manera que desde nuestros propios recursos genéticos se aproveche la posibilidad de mejorar el hato nacional, en lo posible con una estimación adecuada del valor genético con el que se cuenta de forma fundamental, según los fines productivos y comerciales

que se busquen, para cubrir las demandas internas y el comportamiento de los mercados internacionales (Restrepo, 2008).

Según el Banco Nacional de la República la ganadería fue “la industria que constituyó al país”. Actualmente la agremiación, la innovación, la sostenibilidad, y las políticas nacionales han hecho que este negocio continúe siendo importante para el país; según el presidente de la Unión Nacional de Asociaciones Ganaderas (UNAGA), 500.000 familias se dedican a la producción del sector ganadero en Colombia, genera empleo para 250.000 personas, hay 30 millones de hectáreas ocupadas por ganaderos, pero por hectárea solo hay 0,6 cabezas de ganado la carga por hectárea debería ser alrededor de 4.5 cabezas; actualmente hay 22.5 millones de cabezas de ganado, existen entre 80 y 100 organizaciones gremiales, nacionales, regionales y departamentales; la ganadería es el 21% del PIB total agropecuario, se suple la demanda interna de carne bovina en un 91%, también se suple la demanda interna de leche de vaca en un 95%, se producen alrededor de 950.000 toneladas de carne por año, el consumo per cápita de leche es de 140 litros al año, el consumo per cápita de carne al año es de 19 kilos, la industria cárnica y láctea mueve alrededor de 14 billones de pesos al año (Agricultura de las Americas , 2022).

A nivel mundial, más de 750.000 embriones se producen anualmente mediante superovulación y más de 450.000 embriones son producidos usando técnica in-vitro; también más de 121.000 donantes son superpobladas y más de 670.000 son transferidos. Alrededor de 41.000 embriones producidos in-vitro habrían sido transferidos en el año 2000. La producción de embriones in-vitro ha aumentado

significativamente en todo el mundo casi 300.000 embriones producidos en el 2006, igualmente en Canadá en el mismo año se produjeron más de 127.000 embriones in- vitro. El crecimiento de la producción y transferencia de embriones in-vitro en Norteamérica y a nivel suramericano ha sido acompañado por el desarrollo de laboratorio en universidades y centros privados los embriones son producidos de ovocitos colectados de animales in-vivo (Colazo & Mapleton, 2007).

## **Técnicas para la obtención de embriones**

### ***Embriones in vivo***

Para llevar a cabo el proceso de obtención de embriones in vivo, lo primero que se debe de hacer es inducir la ovulación múltiple (OM) de la donadora, esto se logra mediante una técnica de manipulación hormonal que induce un mayor número de ovulaciones por hembra durante un ciclo estral. En los protocolos de OM las hembras donantes son inducidas mediante el tratamiento con hormona foliculoestimulante (FSH) para favorecer la liberación de múltiples ovocitos en el momento de la ovulación. Estas hembras son servidas con semen de toros probados y de gran valor genético (Lopez R. , 2019), con la finalidad de poder fecundar la mayoría de los ovocitos, para posteriormente, realizar la recolección de embriones a través del procedimiento de infusión uterina. Una vez realizada la técnica, se determina el número total de estructuras recolectadas, ya sea embriones transferibles, embriones degenerados u ovocitos no fertilizados, de los cuales únicamente se transfieren embriones de grado 1 o 2 en fresco que posteriormente se explicara en qué consisten los grados de los embriones, o se criopreservan para su posterior uso (Lamb, Fontes, & Oosthuizen, 2021-2019). En promedio, se

recuperan 6.4 embriones transferibles por donadora en cada tratamiento de inducción de OM (Vaina, 2019).

### ***Embriones in vitro***

La producción de embriones in vitro (PIV) es una biotecnología reproductiva que impacta los sistemas ganaderos favoreciendo el mejoramiento genético y que también se ha utilizado como modelo de investigación del desarrollo embrionario en otras especies. Para el desarrollo de esta técnica, se colectan ovocitos in vivo por medio de laparoscopia y aspiración folicular guiada por ultrasonografía o a través de ovarios recolectados en plantas de sacrificio. Los ovocitos son sometidos a procesos de maduración in vitro, utilizando diversos medios, adición de gonadotropinas y factores de crecimiento. Los espermatozoides son sometidos a tratamientos de capacitación espermática in vitro, donde adquieren capacidad fertilizante y se separan los espermatozoides vivos de los componentes seminales y crioprotectores. Para la fertilización in vitro se realiza un cultivo de espermatozoides y ovocitos en un medio que favorece la actividad espermática y penetración de la zona pelúcida. Posteriormente, los embriones obtenidos son sometidos a cultivo en medios que contengan fuentes de energía; aminoácidos y factores de crecimiento, con el fin de mantener su sobrevivencia y desarrollo (Gonella, Atuesta, Bernal, & Chacon, 2013).

## **Aspiración folicular**

la aspiración folicular guiada por ultrasonografía (OPU), es una técnica mediante la cual los ovocitos inmaduros son recolectados de los folículos en los ovarios de una vaca viva (Gonzales & Soto, 2005).

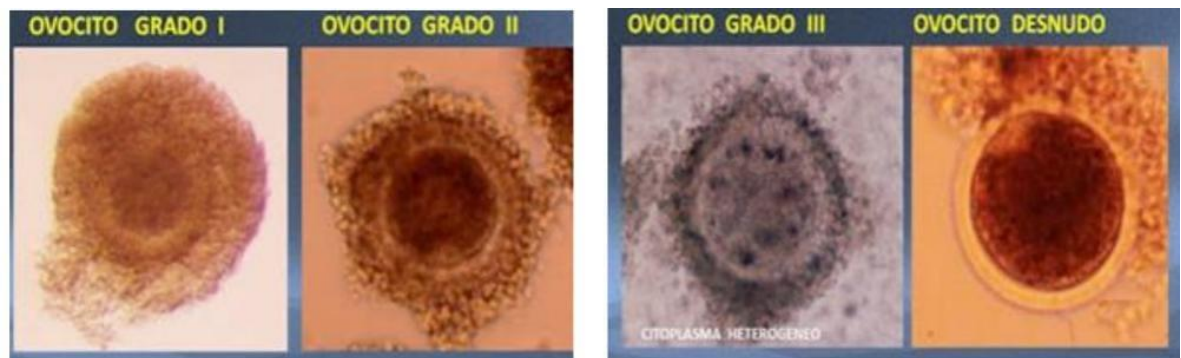
El sistema de aspiración folicular guiado por ultrasonografía está formado por tres componentes principales: escáner de ultrasonido con transductor o sonda de ultrasonido, bomba de aspiración y un sistema de guía, unida a una aguja que se encuentra acoplado al tubo recolector de ovocitos. Durante el procedimiento la donante debe recibir anestesia epidural baja con lidocaína al 2% (3-5 ml/vaca), luego de esto se debe proceder a limpiar y desinfectar la vulva y el perineo. Una vez realizada la higiene; se introduce el transductor, la cabeza del transductor será fijada en posición cráneo dorsal sobre el lado derecho o izquierdo del cérvix, dependiendo el ovario que será puncionado. Luego se introduce la mano por el recto y se fija el ovario contra la cabeza del transductor, lo que permite visualizarlo en la pantalla del equipo de la ultrasonografía, al igual que a los folículos y la aguja. A su vez en la pantalla de la ultrasonografía podemos apreciar la trayectoria de la aguja lo que nos permite ubicar los folículos para lograr una aspiración. Una vez ubicado el folículo a aspirar, se impulsa la aguja suavemente para que penetre la pared vaginal y luego la pared del ovario; una vez logrado esto, va a la bomba de vacío que aspira el contenido folicular junto con el ovocito. En cualquiera caso estos deben tener medios de aspiración heparinizados (cloruro de sodio, suero fetal bovino, antibiótico, antimicótico entre otros) (Palma & Gottifried, 2001).

Después de realizar el aspirado se procede a la clasificación de los oocitos de la siguiente manera:

**Grado I (GI)** Ovocitos con más de tres capas de células de cumulus compactas, además con citoplasma homogéneo uniformemente granulado (Tinco, 2020).

**Grado II (GII)** Ovocitos que presenta parcialmente células del cumulus compacto, con menos de tres capas de células de granulosa, con citoplasma con granulaciones heterogéneas (Tinco, 2020).

**Grado III (GIII)** Ovocitos con presencia de células del cumulus expandido, con citoplasma reducido, fragmentado o degenerado (Tinco, 2020).



**Ilustración 2** Imagen microscópica de la clasificación de oocitos en la técnica OPU (Filipiak & Larroca, 2010).

**Total:** Son los ovocitos totales encontrados, aunque no todos pasan la clasificación por ende no siguen el proceso de ser seleccionados para la maduración in vitro (Filipiak & Larroca, 2010).

**Maduración in vitro (MIV):** Ovocitos viables, son aquellos aptos para seguir con el proceso, los que van al laboratorio para la maduración in vitro (Filipiak & Larroca, 2010).

Una vez clasificados se determinan cuáles son viables y se depositarán en tubos con medio de maduración, serán gaseados y empacados en la transportadora con una temperatura de 37°C. Al llegar al laboratorio serán almacenados en una incubadora durante 24 horas, y de allí inicia el proceso de fertilización in vitro (FIV) (Gonzales & Soto, 2005).

### **Fertilización in vitro**

La fertilización in vitro es un proceso realizado en el laboratorio donde el ovocito se expone a espermatozoides previamente capacitados para que se produzca la fecundación, proporcionando las condiciones óptimas que simulen lo que ocurre de forma natural. La FIV tiene como propósito producir embriones, llevarlos a estadios avanzados para posteriormente ser transferidos a una hembra receptora (Quintana, Campos, Herrera, Gallego, & Padron, 2012).

La producción de embriones consta de 7 pasos.

1. Maduración de ovocitos: La maduración in vitro es un procedimiento por el cual los ovocitos inmaduros serán cultivados en medio de maduración suplementado con hormonas LH, FSH, estradiol piruvato, suero fetal y antibiótico durante 24 horas siguiendo los protocolos que se manejen en el laboratorio (Puerta, 2006).

**2. Capacitación de los espermatozoides in vitro:** Los espermatozoides serán seleccionados y capacitados utilizando un gradiente de densidades con polímeros que permitan la separación de las células mediante centrifugación como el Percoll. Los tiempos y método de selección serán ajustados a los protocolos que tenga cada laboratorio. Luego de terminar la maduración in vitro y de tener separados los espermatozoides viables, se debe proporcionar un ambiente apto para que ocurra la capacitación espermática y la fecundación (Peixer, Goncalves, Backes, Ferreira, & Castro, 2018).

**3. Proceso de fertilización in vitro (FIV):** Para la fertilización se debe de tener un ambiente que permita el correcto metabolismo de las células del cumulus y del oocito. También debe de mantener la función espermática eficiente. Para esto, el medio utilizado contiene factores capacitantes como heparina, penicilina, hipotaurina y epinefrina. Se pone de 1 a 2 millones de espermatozoides por gota conteniendo en promedio de 20-30 ovocitos y están en esta etapa entre 15-24 horas y pasan a medio de cultivo (Palma & Gottfried, 2001).

**4. Cultivo in vitro de los embriones:** Luego de finalizar la etapa de fertilización in vitro, los oocitos fertilizados son sometidos a la etapa de cultivo hasta 7-8 días, incubados a 38.8°C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub> bajo condiciones controladas. El objetivo de esta etapa es permitir que los oocitos fertilizados se desarrollen hasta un estadio embrionario (Filipiak & Larroca, 2010).

**5. Cambio de medio y clivaje:** Se retira medio de cultivo al día 3 y 6 para una renovación puesto que es el desarrollo embrionario van muriendo algunos, otros avanzan, pero todos dejan desechos, se retiran los desechos y un poco

de medio, luego se vuelve a añadir medio de cultivo. En este paso se realiza el clivaje que consta de la observación de las divisiones celulares por las que el embrión está pasando. Los embriones serán evaluados en los días 3 y 6 para estimar la tasa de clivaje y una previsión de los posibles embriones (Filipiak & Larroca, 2010).

**6. Previsión de los embriones y cambio de medio:** Se realiza una previsión donde se mira cuantos embriones y mórulas hay, con el fin de tener una idea de cuantos embriones se pueden transferir al día siguiente, puesto que se cuenta con un número de receptoras ya establecidas y lo ideal es alcanzar a transferir todo lo sincronizado (Filipiak & Larroca, 2010).

**7. Selección de embriones y empaque:** En el día 7 se realiza la selección y clasificación de los embriones que serán empacados, los embriones se empacan en pajillas con medio de transferencia, lo ideal es que queden en el centro de la pajilla, para que vayan más protegidos; son depositados en la transportadora con una temperatura entre los 36-37 (Filipiak & Larroca, 2010).

### **Clasificación de embriones**

La selección y clasificación de los embriones se determina según su morfología o según su estado de desarrollo.

la integridad de morfofisiología embrionaria según la siguiente tabla.

<b>CODIGO</b>	<b>ESTADO</b>	<b>DIAS</b>
1	No fertilizado	2-4
2	De 2 a 12 células	2-4
3	Mórula	5-6
4	Mórula compacta	6-7
5	Blastocisto temprano	7
6	Blastocisto	7-8
7	Blastocisto expandido	8
8	Blastocisto eclosionado	8-10

**Tabla 1 Código de clasificación de los embriones.**

Según su estado de desarrollo se clasifican en:

**Mórula compacta:** Se da el día 5-6, aproximadamente. Sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa solo el 60-70% del espacio peri vitelino. La compactación es considerada como uno de los signos de diferenciación embrionaria (Perdersen, 1988).

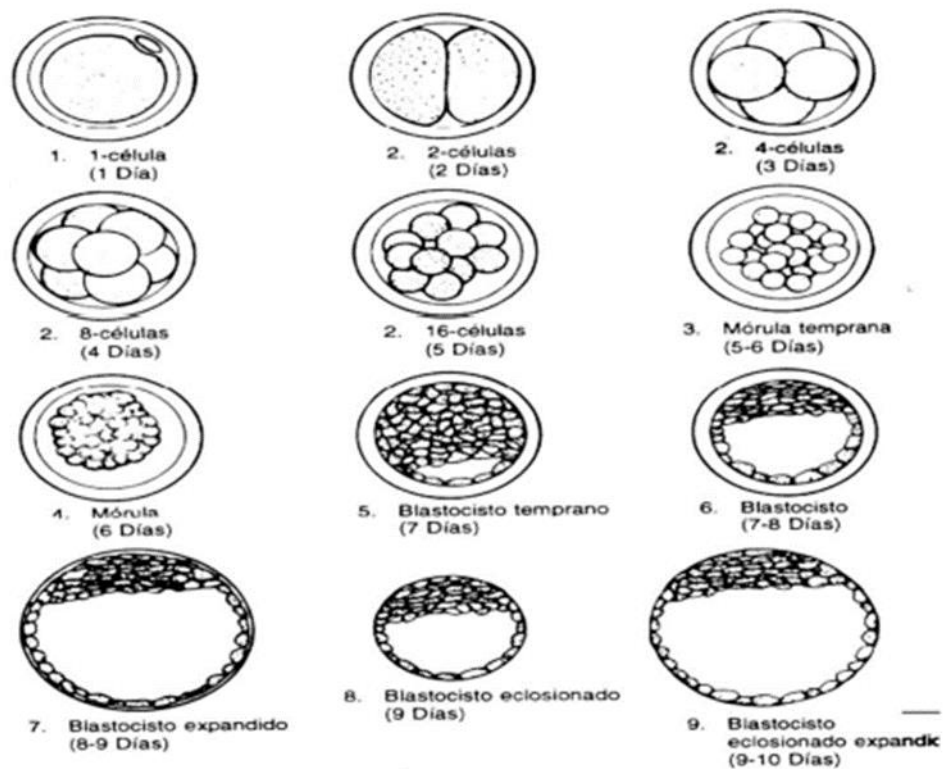
**Blastocisto temprano:** Se desarrolla alrededor del día 7. Se caracteriza por la formación de una cavidad (blastocelo) en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello (Leibo, 1985). El Blastocisto temprano ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Es posible diferenciar el trofoblasto de la masa celular interna (Palma & Gottfried, 2001).

**Blastocisto:** Se obtiene entre los días 7 y 8. Existe una marcada diferenciación entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared que se adosa a la zona pelúcida y la masa celular más oscura (Palma & Gottfried, 2001).

**Blastocisto expandido:** Día 7. La presión creciente del blastocisto en crecimiento provoca la ruptura de la zona pelúcida, a través de la cual comienza su

protrusión. Los embriones recuperados en este estadio se pueden colapsar temporalmente, esto se caracteriza por una pérdida completa o parcial del blastocele (Palma & Gottfried, 2001).

**Blastocisto protruido:** Día 8. Los embriones han abandonado la zona pelúcida. Los Blastocisto en eclosión o eclosionados pueden ser igualmente transferidos, sin embargo, los embriones desprovistos de la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos, razón por la cual se acostumbra a transferir estadios de MO a BX (Palma & Gottfried, 2001).



**Ilustración 3 Estadios del desarrollo embrionario (Filipiak & Larocca, 2012).**

## **Calidad embrionaria**

Los embriones se clasifican según sus características en distintos grados de calidad de la siguiente manera:

Excelente (1): Embrión redondo, simétrico, blastómeros uniformes, intactos y viables, zona pelúcida con superficies lisas, sin concavidades ni malformaciones (Filipiak & Larroca, 2010).

Bueno (2): Irregularidades moderadas, el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable (Filipiak & Larroca, 2010).

Regular (3): Forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales irregulares. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable (Filipiak & Larroca, 2010).

Malo (4): Muerto o degenerado, ovocito de 1 célula, no viables (Filipiak & Larroca, 2012).

## **Criopreservación de embriones**

Los embriones pueden ser conservados mediante diferentes técnicas, las más usadas comúnmente son refrigeración, congelación y vitrificación.

### ***Refrigeración***

Esta técnica es simple permite mantener en condiciones óptimas los embriones a una temperatura de 0 a 4° C durante 24 a 72 horas, se realiza con

solución buffer fosfato suplementada con suero fetal bovino o albumina sérica (PBSS) (Palma & Gottifried, 2001).

### ***Congelado convencional***

La criopreservación tiene como finalidad mantener viable y funcional la célula a temperaturas bajas. La congelación es un proceso mediante el cual las células o tejidos se conservan a bajas temperaturas, generalmente entre -80 y -196°C, ésta última temperatura conocida como el punto de ebullición del nitrógeno líquido, se usa con el fin de disminuir las funciones vitales y de esta manera poder mantener a dichas células o tejidos en condiciones de vida latente suspendida por tiempo indefinido (Cordova A. , y otros, 2015).

### ***Vitrificación***

La vitrificación es una técnica definida como la gelificación de un líquido, producida por una extrema elevación de la viscosidad de soluciones crioprotectoras durante el enfriamiento, siendo la única técnica de criopreservación que elimina cristales de hielo en la célula y el medio que lo rodea (Rodriguez & Jimenez, 2011).

Para esta técnica se utilizan altos niveles en concentraciones de crioprotectores. la pajilla con el embrión es colocada directamente en nitrógeno líquido. No se forman cristales y la solución congelada forma un material como el vidrio, de allí el nombre de la técnica (Colazo & Mapletoft, 2007).

### ***Soluciones crioprotectoras***

Son sustancias que protegen a la célula cuando es sometida a bajas temperaturas y son necesarios en las soluciones de congelación para prevenir el

daño celular durante la congelación y descongelación de embriones bovinos (Guerra, Solis, Sandoya, & de Armas, 2012).

1. No penetran (impermeables, extracelulares) de alto y bajo peso molecular (Guerra, Solis, Sandoya, & de Armas, 2012)

2. Penetran (Permeables, intracelulares) de bajo peso molecular (Guerra, Solis, Sandoya, & de Armas, 2012).

**De bajo peso molecular:**

Glucosa, Sacarosa y otros azúcares. Deshidratan las células antes de la congelación minimizando la formación de cristales. Estabilizan la estructura de la membrana (Guerra, Solis, Sandoya, & de Armas, 2012).

**De alto peso molecular:**

Polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano, sorbitol, sucrosa, lactosa. Trealosa, rafinosa, Protegen en congelación/descongelación alterando el tamaño y la forma de los cristales (Guerra, Solis, Sandoya, & de Armas, 2012).

Penetran (Permeables, intracelulares): Bajo peso molecular: Glicerol, Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 Propanodiol, Etilenglicol (EG), propilenglicol (PG) y etanol. Reemplazan el agua intracelular minimizando la formación de cristales. También regulan la deshidratación y protegen la estructura proteica (Cordova A. , y otros, 2015).

### ***Selección de receptoras***

Para el éxito de la transferencia de embriones es indispensable la correcta elección de las receptoras, de buena calidad y que sean reproductivamente aptas, que tengan un buen nivel de alimentación y estén libres de enfermedades, capaces de llevar una gestación a término (Albeiro, 2001).

Las receptoras deben ser reproductivamente sanas para recibir un embrión y completar la gestación, debe tener un tamaño y peso que les permita parir sin dificultades de 350 kg o más y deben ser de buena capacidad lechera para levantar al ternero de manera que le permita expresar su potencial genético (Albeiro, 2001).

La edad de la receptora es una característica primordial, pero en general difieren en el criterio, es mejor una ternera que una vaca que ya ha parido alguna vez. Los animales jóvenes permiten obtener tasas de gestación ligeramente superior, sin embargo, los problemas de manejo durante la gestación, el parto y la lactancia pueden producir resultados finales muy inferiores a los de las vacas. Las vacas multíparas, con historia reproductiva conocida, garantizan en cierta manera su comportamiento futuro, sumado al hecho de tener menos problemas en el parto, hacen que este sea el animal de elección (Palma & Gottifried, 2001).

### **Procedimiento de transferencia de embriones**

Cuando las receptoras entran en celo son llevadas a la manga y son chequeadas para determinar en qué ovario está presente el cuerpo lúteo (C.L.), porque es allí en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo en donde se va a transferir el embrión. Se inyecta una anestesia epidural alta (con lidocaína al 2%). La región

perineal y vulva se lavan con jabón desinfectante y agua y se secan (Rowe, Campo, & Crister, 1980).

En general los procedimientos para transferir los embriones son similares, como es la inseminación artificial, los catéteres y pistolas son más largos, ya que son introducidos hasta el cuerno uterino (Colazo & Mapletoft, 2007).

El embrión es colocado dentro de una pajilla esterilizada (0.25–0.5 ml) a la que se le ha cortado un extremo (aproximadamente 1,5 cm.). Posteriormente la pajilla con el embrión se coloca dentro de la pistola de transferencia y ésta dentro de la funda plástica que, previamente ha sido esterilizada (Colazo & Mapletoft, 2007).

Con la mano, el operador vía rectal sujeta el cérvix para pasar la pistola por los anillos cervicales y posteriormente dirigirse al cuerno ipsilateral al ovario que tiene el cuerpo lúteo. Una vez en la posición deseada (un poco más allá del cuerpo del útero) el embrión es depositado suavemente y la pistola se retira lentamente. Todo este procedimiento debe realizarse lo más rápido y delicadamente posible. El exceso de manipulación producirá daño a la mucosa del útero, que se traducirá en una baja en los resultados (Colazo & Mapletoft, 2007).

## Materiales y métodos

### Ubicación del estudio

El estudio fue realizado entre junio y agosto del 2021 en la hacienda Real Wood, ubicada en el corregimiento Centro Alegre, perteneciente al municipio de Planeta Rica, departamento de Córdoba, con una altitud de la cabecera municipal de 87msnm, temperatura media 28-32 °C (Alcaldía de Planeta Rica, s.f.).

### Descripción de la población de estudio

**Donadoras:** La población de análisis estuvo conformada por 11 donadoras de la raza Nelore, con una condición corporal media de 4/5, seleccionados por características sobresalientes de fenotipo y genotipo. Las donantes se encontraban en potrero, su alimentación de forraje verde *Brachiaria Humidicola* a voluntad y sal mineralizada al 8%.

**Receptoras:** Se contó con 45 receptoras de cruces como: Brahmolando, Guzolando, en su mayoría criollo cebú por Guzerat, de ellas, 14 novillas y 31 vacas paridas, con una condición corporal media de 3,5/5, con manejo de alimentación de forraje verde a voluntad y sal mineralizada.

Todos los animales se encontraban en un mismo lote.

### Obtención de embriones

**Obtención de oocitos:** Para la obtención de los embriones se realizó una obtención de ovocitos mediante aspiración folicular guiada por ultrasonografía. Para este procedimiento la donante recibió anestesia epidural baja mediante la

administración de 3 a 5 ml de lidocaína 2%, luego de esto se realizó desinfección de la vulva y el periné. Los ovocitos recuperados fueron seleccionados según su clasificación y empacados en medio de maduración para ser llevados al laboratorio.

### ***Fertilización in vitro***

Una vez se tienen los oocitos en el laboratorio se realiza fertilización in vitro con semen de toros de raza Nelore el proceso tarda 7 días, cuando se obtienen los embriones en el día 7 se seleccionaron de mayor a menor calidad y fueron empacados en pajillas con medio de transferencia, las pajillas se depositaron en una transportadora que tenía una temperatura de 36-37°C.

### ***Transferencia de embriones***

Una vez los embriones llegan al lugar de transferencia, a las receptoras se les realizó palpación transrectal para determinar en qué ovario se había dado la ovulación, medir el tamaño del cuerpo lúteo, el cual debía ser superior a 16mm óptimo para la implantación del embrión, posterior se realizaba el proceso de transferencia de embriones.

Las receptoras fueron evaluadas a los 30 días (DX1) post transferencia para determinar si se había dado la implantación del embrión. Posteriormente fueron chequeadas a los 90 días (DX3 entrega) donde se confirman la preñez y las pérdidas embrionarias.

## **Análisis estadístico**

Los datos fueron obtenidos y organizados en Microsoft Excel, se realizó un análisis de tipo descriptivo, los datos fueron verificados por medio de la plataforma de la empresa Embriones Del Sinú.

## Resultados

Durante el periodo de estudio solo se realizó un trabajo de aspiración folicular a cada donante, obteniendo un total de 256 ovocitos de los cuales el 87% (222/256) fueron considerados aptos para el proceso de MIV, de estos el 90% fue clasificado como GIII, mientras que solo el 5 y 7 % fueron clasificados como GII y GI respectivamente (Tabla 2).

Donador a	Viables para MIV		Distribución según la clasificación de XX		
	Ovocitos totales	oocitos viables n (%)	GI n (%)	GII n (%)	GIII n (%)
1	5	3 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
2	4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	16	14 (88%)	1 (7%)	1 (7%)	12 (86%)
4	14	12 (86%)	1 (8%)	1 (8%)	10 (83%)
5	18	15 (83%)	0 (0%)	1 (7%)	14 (93%)
6	23	18 (78%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (100%)
7	10	8 (80%)	0 (0%)	1 (13%)	7 (88%)
8	38	35 (92%)	2 (6%)	2 (6%)	31 (89%)
9	80	75 (94%)	2 (3%)	3 (4%)	70 (93%)
10	36	32 (89%)	1 (3%)	1 (3%)	30 (94%)
11	12	10 (83%)	0 (0%)	0(0%)	10 (100%)
<b>TOTAL</b>	<b>256</b>	<b>222 (87%)</b>	<b>7 (3%)</b>	<b>10 (5%)</b>	<b>205 (92%)</b>

**Tabla 2 Cantidad de oocitos recuperados mediante OPU y clasificación según su calidad en 11 donadoras nelore.**

De los 222 ovocitos considerados viables para el proceso MIV solo se logró la fertilización de 45 de ellos, lo que corresponde a una tasa de fertilización del 20,3%, solo de 4 de las hembras donantes no se logró obtener ningún embrión. Del total de embriones obtenidos el 87% correspondió a una clasificación BX, mientras que el 11% fue clasificado Bn, y solo un 5% como BI (Tabla 3).

Donante	MIV	Aptos para transferir	para clasificación obtenidos por calidad	de embriones		
				Bx n (%)	Bn n (%)	Bl n (%)
1	3	1	33,3%	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0	0	0,0%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3	14	2	14,3%	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
4	12	3	25,0%	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)
5	15	2	13,3%	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)
6	18	2	11,1%	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
7	8	0	0,0%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
8	35	14	40,0%	14 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
9	75	9	12,0%	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
10	32	6	18,8%	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
11	10	6	60,0%	5 (83%)	0 (0%)	1 (17%)
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>45</b>	<b>20,3%</b>	<b>39 (87%)</b>	<b>5 (11%)</b>	<b>1 (2%)</b>

**Tabla 3 Total de embriones obtenidos median FIV y clasificacion por calidad de 11 donadoras nelore.**

Al momento de la transferencia se obtuvo una respuesta de las receptoras al protocolo de sincronización del 89% (40/45), por lo que de los 45 embriones obtenidos solo fueron transferidos 40, teniendo en cuenta su calidad, siendo transferidos con preferencia los catalogados como Bx, seguido de los Bn, en cuanto a aquellos clasificados como Bl no fueron transferidos.

Cuando se realizó el diagnostico gestacional a los 35 días post transferencia se obtuvo una tasa de gestación de 52,5% y a los 90 días de 50%, registrando una perdida embrionaria entre los 30 y 90 días de gestación del 5% (Tabla 4).

Clasificación embriones		Gestación a los 30 días n (%)	Perdida embrionaria a los 30 días	Gestación a los 90 días	perdida embrionaria a los 90 días
<b>Bx</b>	1	1 (100,0%)	0,0%	1 (100%)	0%
	2	1 (50,0%)	50,0%	1 (50%)	0%
	3	3 (100,0%)	0,0%	3 (100%)	0%
	2	2 (100,0%)	0,0%	2 (100%)	0%
	2	0 (0,0%)	100,0%	0 (0%)	0%
	10	7 (70,0%)	30,0%	7 (70%)	0%
	9	7 (77,8%)	22,2%	6 (67%)	14%
	4	0 (0,0%)	100,0%	0 (0%)	0%
	2	0 (0,0%)	100,0%	0 (0%)	0%
<b>Bn</b>	4	0 (0,0%)	100,0%	0 (0%)	0%
	1	0 (0,0%)	100,0%	0 (0%)	0%
<b>Total</b>	40	21 (52,5%)	47,5%	20 (50%)	5%

**Tabla 4 Tasa de gestación y Perdida embrionaria a los 30 y 90 días, en un protocolo de transferencia de embriones.**

## Discusión

En este estudio los resultados obtenidos en cuanto al número de oocitos recuperados mediante aspiración folicular fue similar en lo reportado en otros estudios en vacas Holstein de Lima, Perú, de igual manera al analizar la distribución de los oocitos según su calidad los resultados también fueron análogos, pues también encontraron una mayor cantidad de oocitos Tipo III (Alvarado, Gamarra, Gallegos, & Samillan, 2017), resultados similares fueron reportados también en vacas F1 (Holstein X Bon) en las que encontraron una mayor frecuencia de oocitos grado III (Giraldo, Ordoñez, Gomez, & Restrepo, 2017) .

Al evaluar la tasa de fertilización de los oocitos los resultados de este estudio difieren de estudios previos realizados en oocitos aspirados de vacas posmortem en los que se reportaron tasas de fertilización del 71.4% (Fernandez, Diaz, & Muñoz, 2007) y del 40.5% (Vargas, y otros, 2021). La diferencia observada con estos estudios puede ser explicadas por el método de colecta de oocitos y su manipulación hasta la fertilización, pues el hecho de ser realizada posmortem requiere menor manipulación, facilitando la obtención de oocitos y esto quizá mejora su calidad.

En un estudio realizado en Perú Muestran un mayor porcentaje de preñez reportando un 66% de éxito al transferir los embriones con clasificación calidad (Bx) (Murga, Cortez, Vasquez, Frias, & Urupeque, 2015), de igual similitud con un estudio publicado en el departamento de Santander, Colombia, en el cual se demostró que los blastocistos(Bx) resultaron en mayores porcentajes de preñez,

comparados con fases de mórulas, blastocitos expandidos (Be) y blastocitos eclosionados (Bn) (Ariza, Camacho, & Serrano, 2006), por otro lado un análisis realizado en el Amazonas con el método aspiración posmortem, se observó que de 6 embriones transferidos en etapa de blastocisto se obtuvieron 2 preñeces, lo cual representa un 33.3% de efectividad (Briceño, 2018). Lo que concuerda con lo realizado en este estudio donde se evidencia mayor tasa de preñez utilizando embriones en estadio de blastocisto (Bx) con un resultado del 50% de éxito. Esto puede ser explicado debido a que en ese estadio las estructuras que componen el embrión se encuentran bien definidas y a que se produce un bloqueo del desarrollo de los embriones cuando estos pasan de 8 a 16 células que, aunque no implica la muerte inmediata del embrión, sí constituye un punto de inflexión irreversible en el crecimiento futuro, por lo cual el blastocisto es una etapa temprana es la etapa más propicia para la transferencia (Vargas, y otros, 2021).

se debe tener en cuenta factores que disminuyen la calidad de ovocito y por lo tanto afecta la conversión de ovocito a embrión, los factores pueden ser varias desde lo ambiental, manipulación, temperatura en la que conservan los ovocitos hasta su selección en el laboratorio, tiempo que se tardan en seleccionarlos, medio de transporte, etc. De esto podemos concluir que la calidad y cantidad de ovocitos obtenidos pueden variar por diversos factores los cuales se deben conocer y evitar para así tener mejores resultados. (Palma & Gottfried, 2001)

## **Conclusiones**

Este trabajo es uno de los pocos reportes realizados en Colombia, y aporta al uso de biotecnologías reproductivas en las condiciones de trópico bajo. Los resultados obtenidos permiten considerar los protocolos OPU-FIV como una opción para el mejoramiento de la ganadería bovina, aunque es necesario mejorar las tasas de éxito del proceso de FIV para estandarizar y masificar su uso en todos los niveles de producción.

## Referencias

(s.f.).

Agencia Nacional de Hidrocarburos, Andi. (2009). *Oportunidades de la cadena de hidrocarburos para la industria nacional 2009-2020*. Obtenido de <https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/PND/4C.%20Cap%C3%ADtulo%20III.pdf>

Agricultura de las americas . (5 de enero de 2022). *El enorme aporte de la ganadería a la economía de colombia*. Obtenido de <https://agriculturadelasamericas.com/pecuaria/productores-ganaderos-y-seguridad-alimentaria-mundial/>

Albeiro, R. (2001). *Manejo de donantes y receptoras*. Obtenido de [http://www.reprobiotec.com/libro\\_rojo/capitulo\\_02.pdf](http://www.reprobiotec.com/libro_rojo/capitulo_02.pdf)

Alcaldía de Planeta Rica. (s.f.). Obtenido de <https://www.tramites-planetarica.gov.co/MiMunicipio/Paginas/Informacion-del-Municipio.aspx>

Alvarado, A., Gamarra, G., Gallegos, A., & Samillan, V. (2017). Tasa de recuperación de ovocitos en vacas holstein en descarte. *Anales científicos* , 77, 63-68.

Alvaro Diaz, J. A. (2007). Historia contemporánea: las técnicas complejas de reproducción asistida. *Ginecología y Obstetricia de México*, 75, 295.

Ariza, L., Camacho, W., & Serrano, C. (2006). Evaluación retrospectiva de la tasa de preñez obtenida por transferencia de embriones en diferentes cruces bovinos en el municipio de Puerto Araujo, Santander, Colombia. *Redvet*, 7, 3-8.

Asocebu colombia. (s.f.). *Nelore*. Obtenido de <https://www.asocebu.com/index.php/nelore>

- Bedoya, M. (1994). *Asociación de Ganaderos de la Sierra y Oriente (Ecuador); Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA);* . Sierra ecuatoriana.
- Bonilla, L., Bonilla, D., & Gomez, R. (2021). Producción de embriones bovinos del laboratorio invitro colombia durante el año 2019. *Working Papers ECAPMA*, 5, 1-6.
- Bonilla, L., Bonilla, D., & Guillermo, R. (2021). Produccion de embriones bovinos de laboratorio in vitro en Colombia duranteel año 2019. *Working Papers ECAPMA*, 16, 1-6.
- Briceño, Y. (2018). Desarrollo embrionario in vitro y tasa de concepcion a partir de ovocitos bovinos vitrificados y fertilizados in vitro. 16-23. Obtenido de [https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/1495/BRICE%  
%c3%91O%20MENDOZA%20YANDER%20MAVILA.pdf?sequence=1&isAll  
owed=y](https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/1495/BRICE%c3%91O%20MENDOZA%20YANDER%20MAVILA.pdf?sequence=1&isAll owed=y)
- Cabrera, M., Garnero, A., Lobo, R., & Gunski, R. (2001). Efecto de la incorporación de la covarianza genética directa-materna en el análisis de características de crecimiento en la raza Nelore. *Live stock Researchfor rural development*, 13. Obtenido de <https://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd13/3/cabr133.htm>
- Colazo, M., & Mapletoft, R. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria* , 9, 33-34.
- Colazo, M., & Mapleton, R. (2007). Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Ciencia Veterinaria*, 9, 20-21.
- Cordova, A., Guerra, J., Villa, A., Olivares, J., Cansino, G., & Perez, J. (2015). *Revista complutense de ciencias veterinarias*, 9, 30-32.
- Cordova, A., Guerra, J., Villa, A., Olivares, J., Cansino, G., Juarez, M., & Perez, J. (2015). Congelación de embriones bovinos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9, 22-40.

- Cutini, A., Tereul, M., & Cabodevilla, J. (2000). *Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos* . Obtenido de [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/transplante\\_embrionario/02-factores.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embrionario/02-factores.pdf)
- Fao. (s.f.). *Métodos de mejora genética en apoyo de una utilización sostenible*. Obtenido de Estado de la cuestión en la gestión de los recursos zoogenético: <https://www.fao.org/3/a1250s/a1250s18.pdf>
- Fernandez, A., Diaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción In vitro de Embriones Bovinos. *Revista de la facultad de ciencias veterinarias* , 48.
- Filipiak, Y., & Larocca, C. (2012). Biotecnología en reproducción bovina . *Facultad de Veterinaria – Universidad de la República Departamento de Reproducción Animal Área de Biotecnología*, 1-17.
- Filipiak, Y., & Larroca, C. (2010). Fertilización in vitro en bovinos. En M, *Fertilización in vitro en bovinos* , *Manual teórico-práctico* (págs. 1-20). Montevideo, República Oriental del Uruguay: Área de Biotecnología de la Reproducción Animal , facultad de veterinaria.
- Fundación Chile. (2008). *Manual de reproducción bovina*. Obtenido de <https://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/manual-de-produccion-bovina-para-extensionistas.pdf?sfvrsn=0>
- Giraldo, J., Ordoñez, S., Gomez, J., & Restrepo, G. (2017). Evaluación de la estimulación ovárica y la calidad de oocitos bovinos obtenidos por aspiración folicular. *Journal of Agriculture and animal sciences*, 7, 20-25.
- Gonella, A., Atuesta, J., Bernal, S., & Chacon, L. (2013). Generalidades de la producción de embriones bovino in vitro. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 4, 65-67.
- Gonzales, C., & Soto, E. (2005). *Manual de Ganadería Doble Propósito*. Maracaibo-Venezuela.: Ediciones Astro Data, S.A.

- Gonzales, H., & Mauricio, G. (2005). Biotecnología reproductiva: una alternativa para mejorarla producción animal. *Biotempo*, 5-11.
- Guaqueta, H. (2009). Ciclo estral: fisiología básica y estrategias para mejorar la detección de celos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56, 163-183.
- Guerra, R., Solís, A., Sandoya, G., & de Armas, R. (2012). Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. *REDVET*, 3-17.
- Henao, G., & Trujillo, L. (2000). Establecimiento y desarrollo de la dominancia folicular bovina. *col cienc pec*, 13, 108-110.
- Hernandez Calderon, J. (2016). *Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros*. Ciudad de México: Printed and made in Mexico.
- IETS . (2020). 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 38, 1-4.
- Lamb, G., Fontes, P., & Oosthuizen, N. (2021-2019). In vitro fertilization (IVF) versus multiple ovulation embryo transfer (moet): making the decision to use one or both. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 233-236.
- Leibo, S. (1985). The embryology of embryo transfer. *Embryo transfer in cattle. Lloyd donaldson*, 32-53.
- Lopez, R. (2019). *Tasa de gestación en novillas bos taurus x bos indicus con embriones in vivo e in vitro, transferidos en frescos y desvitrificados*. Obtenido de <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/1944/50887/LopezAguirreRicardo.pdf?sequence=1>
- Lopez, R. (12 de Septiembre de 2020). *Tasa de gestación en novillas bos taurus x bos indicus con embriones in vivo e in vitro, transferidos en fresco y desvitrificados*. Obtenido de

<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/1944/50887/LopezAguirreRicardo.pdf?sequence=1>

- Maldonado, J. (2008). Racionalidad de los esquemas de superovulación y sincronización en la transferencia de embriones en bovinos: ¿terapéutica basada en la evidencia o ausencia de ética? *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 437-438.
- Moreno, J. (2004). *Transferencia de embriones en bovinos. Texas*. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/758/1/T2520.pdf>
- Motta, P., Ramos, N., Gonzalez, C., & Castro, E. (2011). Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. *vett.zootec*, 5, 90-91.
- Murga, N., Cortez, J., Vasquez, H., Frias, H., & Urupeque, K. (2015). Efecto del estado de desarrollo de la tasa de preñez después de transferir embriones bovinos producidos in vivo. *Spermova*, 5, 55-58.
- Orellana, J., & Peralta, E. (2007). *Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International*. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/758/1/T2520.pdf>
- Oyuela, L., & Jimenez, C. (2010). Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *rev.med.vet.zoo*, 57, 192.
- Pacheco, A., Maldonado, G., Sierra, H., Lancharos, J., & Porras, J. (2018). Biotecnología de la reproducción. *Conexion Agropecuaria JDC*, 8, 594-595.
- Palma, G. A. (2008). *Biotecnología de la reproducción. Ciencia, tecnología y sociedad*. Obtenido de [http://reprobiotec.com/libro\\_verde/cap\\_01.pdf](http://reprobiotec.com/libro_verde/cap_01.pdf)
- Palma, G., & Gottifried, B. (2001). Biotecnología de la reproducción. En G. Palma, *Biotecnología de la reproducción* (págs. 1-14).
- Pasa, C. (2008). Transferencia de embriones en bovinos. *Biodiversidade*, 7, 67.

- Peixer, P., Goncalves, J.-., Backes, C., Ferreira, J., & Castro, C. (2018). Produção in vitro de embriões bovinos In vitro embryo production in cattle. *Revista Espacios*, 39, 2.
- Perdersen, R. (1988). Early mammalian embryogenesis. *The physiology-New York EWD*, 1187-230.
- Puerta, L. (2006). *Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular OPU y fecundación in vitro FIV como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras o de las hembras cebuinas dentro del plan de modernización del hato ganadero colombiano*. Obtenido de Universidad de La Salle: <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1134&context=zootecnia>
- Quintana, M., Campos, P., Herrera, P., Gallego, C., & Padron, E. (2012). Comparacion de dos metodos de recoleccion de ovocitos inmaduros para fertilizacion in vitro fiv objetivos de hembras bubalus bubalis enviadas a matadero. *Revista de salud animal*, 34, 54-56.
- Restrepo, G. (2008). Biotecnologia reproductiva aplicables a la reproduccion bovina en colombia. En G. Restrepo. Medellin.
- Revista Genetica bovina colombiana. (27 de Noviembre de 2021). *Aspiración folicular: cómo se hace*. Obtenido de <https://revistageneticabovina.com/biotecnologia/aspiracion-folicular/>
- Rippe, C. A. (2009). El ciclo estral. *In Dairy Calttle Reproduction Conference*, 111-113.
- Rodriguez, P., & Jimenez, C. (2011). Crioperservacion de embriones bovinos producidos in vitro. *Med.Vet.Zoot*, 107-119.
- Rowe, R., Campo, R., & Crister, J. (1980). Embryo transfer in cattle: nonsurgical transfer. *American Journal of Veterinary Research*, 41, 1024-1028.

- Salgado, R., Rugeles, C., & Alvarez, J. (2005). Efecto de la heparina y de la concentración espermática sobre el porcentaje de fertilización de oocitos bovinos in vitro. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*, 18, 122-123.
- Sarmiento, S., & Naulaguari, L. (2019). *Valoración de ovocitos obtenidos mediante Ovum pick-up en vaquillas sometidas a protocolos alternativos de sincronización de la onda folicular y estimulas con FSH-LH*. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31787/1/Trabajo-de-titulaci%C3%B3n.pdf>
- Sintex. (2005). *Fisiología Reproductiva Del Bovino*. Sitio Argentino de Producción Animal,. Obtenido de [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/71-fisiologia\\_reproductiva\\_del\\_bovino.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/71-fisiologia_reproductiva_del_bovino.pdf)
- Thibier, M. (2001). The animal embryo transfer industry in figures. *Embryo transfer newsletter*. 19:16-22.
- Tinco, J. (2020). *Cantidad, calidad y estado nuclear de ovocitos aspirados según condición corporal de vacas criollas faenadas en el Matadero Municipal de Abancay*. Obtenido de [http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/918/T\\_05702.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/918/T_05702.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Ugalde, R. J. (2014). Biotecnologías reproductivas para el. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 33.
- Vaina, J. (2019). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 36.
- Valencia, F., Sanchez, C., & Baldrich, N. (2017). ciclo reproductivo y dinámica folicular en ganado bos indicus. *Revista Facultad Ciencias Agropecuarias – FAGROPEC. Universidad de la amazonia.*, 2, 68-69.

- Vargas, J., Rondon, W., Acosta, F., Gomez, Y., Montalvo, M., Salvatierra, M., . . . Ratto, M. (2021). Efecto de dos medios de fertilización en el desarrollo in vitro de embriones bovinos criollo. *Revista Inv Vet Peru*, 32, 4-7.
- Zarate, O., Cisneros, J., Canseco, R., Montiel, F., & Carrasco, A. (2018). Transferencia de embriones bovinos criopreservados:efecto de la blastocentesis. *Agrociencia*.