

	UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER OCAÑA			
	Documento	Código	Fecha	Revisión
	FORMATO HOJA DE RESUMEN PARA TRABAJO DE GRADO	F-AC-DBL-007	08-07-2021	B
Dependencia	Aprobado		Pág.	
DIVISIÓN DE BIBLIOTECA	SUBDIRECTOR ACADEMICO		i (40)	

RESUMEN – TRABAJO DE GRADO

AUTORES	Wilson Eduardo Gómez Sogamoso		
FACULTAD	Ciencias Agrarias Y Del Ambiente		
PLAN DE ESTUDIOS	Zootecnia		
DIRECTOR	Leonardo Hernández Corredor		
TÍTULO DE LA TESIS	Influencia De Los Medios De Cultivos En La Producción De Embriones Bovinos In Vitro En Colombia		
TITULO EN INGLES	Influence Of Culture Media On In Vitro Bovine Embryo Production In Colombia		
RESUMEN			
<p>La Presente Monografía Titulado Influencia De Los Medios De Cultivos En La Producción De Embriones Bovinos In Vitro En Colombia. Contienen Los Diferentes Lineamientos En Los Sistemas Productivos Embrionarios Y Los Medios De Cultivos Que Están Permitidos Por El Instituto Colombiano Agropecuario – ICA, Todo En Función De Mejorar El Ingreso Económico De los Pequeños Y Medianos Productores Dedicados Al Mejoramiento Genético De La Especie Bos Indicus Y Bos Taurus.</p>			
RESUMEN EN INGLES			
<p>This monograph entitled Influence of culture media on the production of bovine embryos in vitro in Colombia. They contain the different guidelines in embryonic production systems and culture media that are allowed by the Colombian Agricultural Institute – ICA, all in order to improve the economic income of small and medium producers dedicated to the genetic improvement of the species Bos indicus and Bos taurus.</p>			
PALABRAS CLAVES	Embriones, <i>In Vitro</i> , Suplementación, Cultivos, Genética.		
PALABRAS CLAVES EN INGLES	Embryos, <i>In Vitro</i> , Supplementation, Crops, Genetics.		
CARACTERÍSTICAS			
PÁGINAS: 40	PLANOS:	ILUSTRACIONES:	CD-ROM: 1



**Influencia De Los Medios De Cultivos En La Producción De Embriones Bovinos In Vitro
En Colombia.**

Wilson Eduardo Gómez Sogamoso

**Facultad De Ciencias Agrarias Y Del Ambiente, Universidad Francisco De Paula
SantanderOcaña**

Plan De Estudios De Zootecnia

Leonardo Hernández Corredor, PhD Médico Veterinario

Octubre del 2021

Tabla de contenido

Resumen.....	6
Introducción	7
Capitulo 1. Sistema en biotecnología bovina.....	9
1. Sistemas en la producción de embriones.....	10
1.1 Producción de embriones <i>in vitro</i>	10
1.1.1 Hormonas que intervienen los eventos fisiológicos.....	13
1.1.1.1 Hormonas Liberadoras de Gonadotrofinas (GnRH).	13
1.1.1.2 Hormona Folículo Estimulante (FSH)	13
1.1.1.3 Hormona Luteinizante (LH).....	14
1.1.1.4 Estradiol (E2)	14
1.1.1.5 Inhibina 14	
1.1.1.6 Progesterona (P4)	15
1.1.1.7 Prostaglandinas (PGF2a).....	15
1.1.1.8 Oxitocina	15
1.1.2 Superovulación	16
1.1.3 Colecta 18	
1.1.3.1 Clasificación de CCO's	19
1.1.4 Maduración <i>in vitro</i>	20
1.1.5 Fertilización <i>in vitro</i>	21

1.1.6	Clasificación de embriones	22
1.1.7	Criopreservación de embriones.....	24
1.1.7.1	Refrigeración.....	24
1.1.7.2	Congelación convencional o lenta.....	24
1.1.7.3	Vitrificación.	25
1.1.8	Transferencia.....	26
Capítulo 2.	Medios de cultivos	27
1.2	Medios de cultivos y avances en la optimización de la maduración de embriones.	27
Conclusión	32
Referencias	33

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Producción mundial de embriones en 2016, de acuerdo al continente, objetivo de producción (Carne o leche) y tecnología reproductiva (IVD, derivado <i>in vivo</i> ; o IVP, derivado <i>in vitro</i>).	12
Tabla 2. <i>Esquema de superovulación en donadoras.</i>	17

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema del proceso de producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos	11
Figura 2. Técnica de colecta por Aspiración folicular transvaginal	18
Figura 3. Clasificación de CCO's	20
Figura 4. Clasificación de embriones bovinos	23
Figura 5. Representación esquemática de un embrión durante los pasos lentos de congelación y vitrificación	25

Resumen

La transferencia de embriones es una biotecnología en auge cuya eficiencia se encuentra en continuo avance científico, en Colombia es relativamente nueva y su investigación es limitada, sin embargo, múltiples estudios en el continente le han permitido dar una aproximación de lo que serían sus resultados en el trópico, abarca una serie de procesos como la colecta y selección de ovocitos, maduración *in vitro*, fertilización *in vitro*, maduración y clasificación de embriones, transferencia y/o crio-preservación, cada uno de estos procesos cuenta con diferentes métodos que buscan mejorar el rendimiento de la obtención del material genético. En lo referente a los estudios que abordan el mejoramiento de los medios de cultivo de embriones comerciales a través de suplementos, se encuentran diferentes aditivos que influyen en la calidad y cantidad de embriones obtenidos de acuerdo a las técnicas evaluadas midiendo su eficiencia en el número de embriones obtenidos al día 7-9 de maduración, porcentaje de preñez post transferencia y supervivencia de embriones congelados.

Palabras clave: *Transferencia de embriones, maduración de embriones, medios de cultivo, crio-preservación de embriones.*

Introducción

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos es una técnica que se utiliza en Biotecnología Animal para mejorar el techo genético de las diferentes razas bovinas, dando solución a los problemas de fertilidad, mejorando las características deseables del hato.

La técnica de transferencia de embriones parte desde la aspiración o punción folicular, donde se extraen los oocitos de los folículos de los ovarios de vacas de alto mérito, por medio de un equipo guiado transvaginal (OPU: Ovum pick – up). Los ovocitos inmaduros recuperados se clasifican y se colocan en medios de maduración *in vitro* (MIV) que son alimentados con hormonas y suero de distintas concentraciones para reanudar la meiosis del mismo, luego se realiza la fecundación *in vitro* (FIV) de los ovocitos maduros con la previa capacitación de los espermatozoides del toro seleccionado, por ultimo son colocados en cultivos *in vitro* durante un tiempo aproximado que oscila entre seis (6) y siete (7) días cumpliendo con unas condiciones que los embriones necesitan para su crecimiento y su desarrollo, para finalmente ser criopreservados o transferidos en fresco.

Unas de las grandes ventajas de la aplicación comercial de la técnica de fertilización *in vitro* es que permite almacenar y conservar el material genético deseado de manera continua durante un periodo prolongado; otro de los beneficios es que permite alcanzar la mayor descendencia posible de embriones al año por vaca, además de que se puede utilizar en hembras bovinas a partir del octavo (8) mes de edad. Sin embargo, entre sus desventajas se menciona que esta técnica posee baja tasa de preñez y se le atribuye un alto costo económico (Bernal, 2016).

Una forma de mejorar los medios de producción de embriones *in vitro* es mediante la aplicación de aditivos tales como factores de crecimiento, antioxidantes y ácidos grasos saturados; ya que estimulan el metabolismo y el desarrollo de los embriones, actúan como

protectores reduciendo el estrés celular de los procedimientos *in vitro*, proporcionando un mayor porcentaje de eficiencia en los resultados. En el siguiente escrito se discuten diferentes evidencias de estudios que abarcan los diferentes procesos que involucran la transferencia de embriones en la especie bovina, además de algunas innovaciones en la técnica dadas por la adición de suplementos a los medios de cultivo.

Capítulo 1. Sistema en biotecnología bovina

Cifras del Fondo Nacional del Ganado (FEDEGAN), exponen que, en Colombia, el sector ganadero contribuye al 21,8% del PIB agropecuario, lo cual representa el 1,4% del PIB nacional (FEDEGAN, 2020). Determina también que, el consumo per cápita de carne bovina nacional es de 17kg. Además, indica que, la orientación del hato en Colombia está principalmente en modelos de ganadería de cría y doble propósito, con un 39% y 35%, respectivamente.

Por su parte, la eficiencia reproductiva representa un conjunto de medidas e interpretaciones del ciclo reproductivo, este término se aplica desde los fenómenos del inicio de la pubertad y se manifiesta en la correcta ciclicidad de las hembras, la óptima calidad de los machos y desde luego, se acompaña con las metodologías de selección para la optimización del potencial genético del hato, entre las que se encuentra los protocolos de sincronización de celos, la técnica de inseminación artificial con material genético selecto y a término fijo, transferencia de embriones a término fijo, aspiración folicular, fecundación *in vitro*, entre otras.

Los sistemas ganaderos modernos deben innovar en la aplicación de estrategias de biotecnologías reproductivas para incrementar el aceleramiento de ventajas productivas que pueden obtener a través de los procesos de mejora genética del hato bovino, con el propósito de hacer frente a la creciente demanda de alimentos determinando su objetivo de producción, ya sea el número de terneros al año o los rendimientos de producción de leche. Por lo tanto, es necesaria la toma de decisiones y la planificación de acciones acorde a la búsqueda de un sector más competitivo.

La producción bovina en Colombia ha avanzado paulatinamente en la adopción de técnicas reproductivas, por su parte la biotecnología reproductiva de transferencia de embriones (TE), al igual que otras tendencias de mejora del hato bovino a través de técnicas reproductivas, aumenta

la calidad reproductiva de la hembra y del macho con mérito genético. Consiste en la producción de un embrión e involucra técnicas sucesivas de superovulación, inseminación artificial y recolección del embrión (Hufana & Duran, 2020).

1. Sistemas en la producción de embriones

Estos sistemas han permitido mejora del techo genético y la multiplicación de vacas élite en Colombia con mayor rapidez que la inseminación artificial (IA), generando ventajas desde el lado materno, como la reducción del intervalo generacional, la aceleración de selección de animales con rasgos productivos deseables, el incremento de la producción y la rentabilidad general del sistema a través de la progenie obtenida. En la actualidad existen dos sistemas: la producción de embriones *in vivo* y la producción de embriones *in vitro*. Ambas técnicas permiten incrementar la descendencia de vacas de alto mérito en un tiempo determinado, donde también se puede seleccionar el sexo del linaje con semen del toro previamente sexado, asegurando una eficiencia del 90 al 95%. Adicionalmente, los embriones se pueden criopreservar y almacenar hasta el tiempo en que se necesite, en esta revisión bibliográfica se abordarán la producción de embriones *in vitro* y los avances entorno a la aplicación de esta técnica en diferentes países, entre ellos Colombia. Sin embargo, como indica Bonilla et al., (2021), en Colombia no se reportan datos periódicos sobre la producción de embriones, esto representa un factor negativo para el posicionamiento del país en la aplicación de esta tecnología.

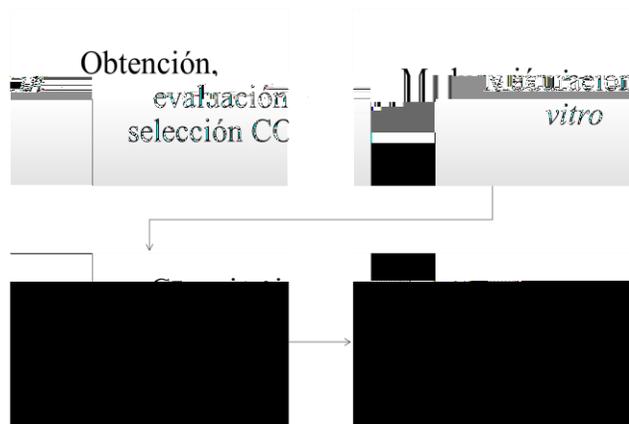
1.1 Producción de embriones in vitro

Se realiza en animales de alto valor comercial mayores de ocho (8) meses de edad por medio de un equipo guiado transvaginal (OPU: Ovum pick – up). Medina & Tovar, (2021) describen esta técnica en 3 fases: la primera, comprende la maduración *in vitro* de los ovocitos, seguido de su fecundación de *in vitro* y por último, el cultivo de los embriones, sin embargo, el

proceso podría iniciarse desde la obtención de los ovocitos (Complejo Cumulus Ovocito) Tal como se muestra en

la Figura 1.

Esquema del proceso de producción in vitro de embriones bovinos.



Fuente: Modificado de Mauri, (2017) pág. 56

Así mismo se tiene que un indicador del éxito del programa es el número de terneros nacidos vivos por donante en un tiempo determinado, además, Medina & Tovar, (2021), señalan que la efectividad de esta técnica está relacionada a diferentes factores como la respuesta de los embriones al estrés inducido por el procedimiento, los sistemas de cultivo y más variables abordadas posteriormente.

Las tendencias de aumento en la producción de embriones *in vitro* se ha visto en diferentes regiones, Moreira, *et al.* (2018), evidenció que en América del Sur se incrementó la producción de embriones, tanto como para fines lecheros como para fines cárnicos, llegando a tener un equilibrio relativo (*Tabla 1*). El autor también hace referencia a que, los principales representantes de esta técnica durante dicho año en el continente Sur Americano fueron Argentina y Brasil quienes a su vez poseen los rebaños más grandes.

Tabla 1.

Producción mundial de embriones en 2016, de acuerdo al continente, objetivo de producción (Carne o leche) y tecnología reproductiva (IVD, derivado in vivo; o IVP, derivado in vitro).

Región	Producción de leche			Producción de carne		
	IVD	IVP	Total (%)	IVD	IVP	Total (%)
África	240	0	240 (3.8)	3,863	2,167	6,030 (96.2)
Asia	13,226	0	13,226 (11.7)	99,372	0	99,372 (88.3)
Europa	99,693	16,68	116,371 (78.2)	29,184	3,296	32,480 (21.8)
Norte América	111,58	136,2	247,779 (41.8)	220,68	124,37	345,047 (58.2)
Oceanía	160	1,956	2,116 (15.3)	7,332	4,364	11,696 (84.7)
South América	17,552	194,4	211,909 (49.6)	29,764	185,45	215,209 (50.4)
Total	642,05	349,2	591,641 (45.5)	390,19	319,64	709,834 (54.5)

Fuente: Tomada de Moreira, *et al.* (2018), pág. 967.

En lo referente a Colombia, la transferencia de embriones, de acuerdo con Ramírez (2020), la IETS ((International Embryo Technology Society) en el 2017 registró un total de 24,503 embriones producidos bajo técnicas invitro, esta técnica ha sido popular en la producción de ganado Brahman y Gyr, obteniendo ejemplares sobresalientes, por ende, aumentando las ganancias genéticas (Oyuela & Jiménez, 2010; (ASOCEBÚ COLOMBIA, 2021). Según Bonilla et al., (2021) los embriones de la raza Gyr son utilizados para obtener hembras de reemplazo en modelos de ganadería de leche, el cual es el que más invierte en este tipo de técnica reproductiva.

Esta preferencia sobre las razas cebuínas coincide con los resultados de estudios recientes de Narváez, (2020), los cuales determinaron que la raza Gyr tiende a presentar mejores valores en la

producción de embriones *in vitro*, frente a la raza Holstein, obteniendo diferencias estadísticas principalmente en el número de folículos visualizados y número de ovocitos recuperados. Sin embargo, otro estudio donde se comparó la tasa de preñez obtenida por embriones *in vitro*, usando semen sexado y semen convencional de especies *Bos taurus* y *Bos indicus*, determinó que el origen genético de los embriones no demostró diferencias, por su parte el tipo de semen si generó valores significativamente más altos tratándose de semen convencional en variables como la producción de embriones *in vitro* 26.5% vs 20.8% ($p < 0.001$) (Bonilla et al., 2018).

Ahora bien, en cuanto a la fisiología de este evento se involucran las hormonas del ciclo estral, a continuación se definen brevemente algunos aspectos de ellas para entender el método de la superovulación.

1.1.1 Hormonas que intervienen los eventos fisiológicos.

1.1.1.1 Hormonas Liberadoras de Gonadotrofinas (GnRH).

El ciclo estral es regulado principalmente por las neuronas que producen las hormonas regidas por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero, GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotrofina). Donde llega a la pituitaria anterior a través del sistema porta-hipotálamo-hipofisiario controlando la liberación de las hormonas LH y FSH por medio de un sistema de retroalimentación positiva, la cual se une a la proteína G que esta acoplada al receptor de las células gonadotrofos. La Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH) es secretada de dos formas: una pulsátil desde el centro tónico del hipotálamo y la secreción preovulatoria (Colazo & Mapletoft, 2014).

1.1.1.2 Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Es una gonadotropina sintetizada y secretada en la hipófisis del cerebro, actuando en las gónadas de la hembra (ovarios), la cual tiene la función de estimular a los folículos primordiales a crecer y migrar a la superficie del ovario, donde el futuro folículo dominante permite que esté

adquiera receptores de la Hormona Luteinizante (LH), en el que sigue creciendo con bajos niveles de FSH y graduales de LH (Gstir, 2010).

1.1.1.3 Hormona Luteinizante (LH)

Es una hormona glucoproteica que regula las funciones reproductivas en los mamíferos, la cual consta de dos (2) cadenas polipeptídicas (alfa y beta). Asimismo, la LH actúa en los ovarios estimulando el desarrollo de los folículos e incrementando la secreción de estrógenos (estradiol), los cuales no solo desencadenan la ovulación y liberación del ovulo, sino que también inicia la transformación del folículo residual en un cuerpo lúteo (CL), dando como resultado la producción de progesterona para preparar al endometrio para una posible implantación (Santos *et al*, 2014).

1.1.1.4 Estradiol (E2)

Los estrógenos ejercen un efecto de retroalimentación positivo sobre el eje hipotalámico-hipofisiario permitiendo que está libere niveles significativos de GnRH, del mismo modo permite que la glándula pituitaria anterior libere LH con el objetivo de que está inicie la fase de ovulación. Además, la hormona esteroidea tiene acción sobre los distintos órganos blancos como la vulva, la vagina, el útero, los cuernos uterinos y el sistema nervioso central, la cual muestra la conducta de celo e indica al macho que la hembra está en estado fértil y aceptación de monta (Soria, 2013).

1.1.1.5 Inhibina

Hormona glucoproteína, producida por el folículo ovárico (células granulosas) que regular los niveles de GnRH en el hipotálamo, ejerciendo una retroalimentación negativa a nivel hipofisiario disminuyendo principalmente las secreciones de FSH (Lliteras & compañía, 2007).

1.1.1.6 Progesterona (P4)

Es una hormona esteroidea derivado del colesterol que se origina en la placenta, las glándulas suprarrenales y principalmente en el cuerpo lúteo por acción de la LH, posterior a la ovulación. Sus efectos se observan en el punto blanco después de estar expuesto un tiempo a la estimulación de los estrógenos. Asimismo, su principal función es preparar al útero para el implante del embrión logrando el éxito de la gestación, aumentando el espesor del epitelio a la vez que suprime el celo e inhibe el desarrollo folicular y la conducta sexual. También, aumenta las secreciones de las glándulas endometriales, en el cérvix induce a la aparición de un tapón mucoso de naturaleza densa y opaca, la quiescencia uterina y la inmunosupresión local del mismo (Contreras, 2017).

1.1.1.7 Prostaglandinas (PGF2a)

Las prostaglandinas en la reproducción juegan un papel importante ya que cuando no se produce un reconocimiento materno son las que producen la lisis del cuerpo lúteo (CL), además sobre los folículos grandes provoca la ovulación y en los folículos pequeños regresión para iniciar una nueva onda folicular, también son las que permite que se efectúe el reconocimiento embrionario, la implantación y por último el parto. En el tejido reproductivo se localizan principalmente en el endometrio, la cual son constituidos por dos biotipos; células endometriales epiteliales (CEEP) y células endometriales estromales (CEES), las cuales poseen funciones y características morfológicas distintas (Lenis, Olivera & Tarazona, 2013).

1.1.1.8 Oxitocina

Es producida en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, es almacenada y liberada por la neurohipófisis, la cual viaja por todo el cuerpo por el torrente sanguíneo. Su función principal es activar las contracciones del miometrio y de las células mioepiteliales de las glándulas mamarias para la bajada de la leche, también interviene en otras funciones tales como:

transporte de los espermatozoides e intervención en el proceso de luteólisis (López; Arámbula & Camarena, 2014).

1.1.2 Superovulación

En los programas de superovulación se aplican una serie de hormonas con el fin de estimular al ovario para que desarrolle y madure un gran número de folículos primordiales a dominantes durante la fase folicular del estro, para que después puedan ser fecundados, colectados, clasificados y transferidos (Betancourth & Cáceres, 2011).

Aguilar, (2019), evaluó la influencia de los métodos de superovulación en la producción de embriones *in vivo* en ganado Simmental y Brangus, el autor encontró que no hubo diferencias en cuanto al número de embriones viables según el protocolo de superovulación ($p \geq 0.10$), sin embargo, determinó que la raza *Bos indicus* (Brangus) generó la mayor cantidad de estructuras para ambos protocolos respecto al Simmental, a continuación se describen los métodos empleados en las donadoras, los cuales varían en un día en la aplicación de la hormona folículo estimulante (FSH).

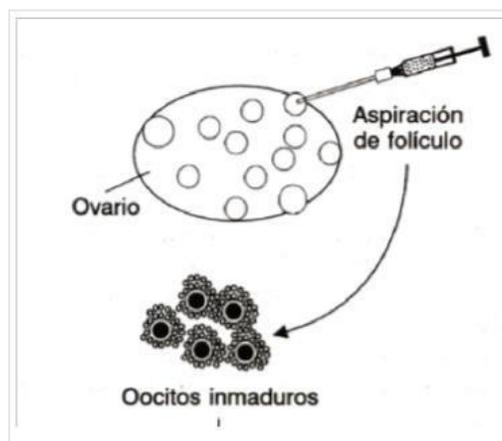
Tabla 2.*Esquema de superovulación en donadoras.*

Día Protocolo	Protocolo 1		Protocolo 2	
	Mañana (6:00am)	Tarde (6:00pm)	Mañana (6:00am)	Tarde (6:00pm)
0	Colocar DIB +0,8ml BE		Colocar DIB +0,8ml BE	
3	4 ml FSH	4 ml FSH		
4	<i>3ml FSH</i>	<i>3ml FSH</i>	<i>4 ml FSH</i>	<i>4 ml FSH</i>
5	2ml FSH	2ml FSH + 3ml Pg	3ml FSH	3ml FSH
6	1ml FSH	1ml FSH + retirar DIB	2ml FSH	2ml FSH + 3ml Pg
7	(9:00am) 3,5ml GnRH	IA	1ml FSH	1ml FSH + retirar DIB
8	IA		(9:00am) 3,5ml GnRH	IA
9			IA	
14	Colecta, búsqueda, evaluación y selección de embriones			
15	Colecta, búsqueda, evaluación y selección de embriones			

Fuente: Tomado de Aguilar, (2019), págs. 6-7.

1.1.3 Colecta

La colecta de los ovocitos se puede realizar a partir de ovarios de frigoríficos con fines comerciales o investigativos, o de donadoras vivas mediante aspiración folicular transvaginal (OPU), procedimientos quirúrgicos y laparoscópicos.



Otro método que cabe mencionar es aquel que involucra los ovocitos provenientes de frigoríficos, donde extraen los ovarios de hembras faenadas, en los 30 minutos siguientes al sacrificio del animal, Castillo & Mantilla, (2020), señalan que los ovarios recolectados se sumergen en solución salina al 0,9%, o solución fosfato-tamponada salina (PBS), acompañadas de soluciones antibióticas. Un estudio realizado en Venezuela comparó dos métodos de recolección de ovocitos de frigoríficos, emplearon la técnica Slicing (Cortes de la superficie ovárica) y la técnica de OPU, considerando como viables aquellos con 2-8mm de diámetro, encontraron que el número de ovocitos buenos y malos fue de $95,2 \pm 48,92$; $28,8 \pm 21,51$ para la técnica OPU y $122,6 \pm 54,71$; $70,0 \pm 47,86$, para Slicing respectivamente ($P > 0.05$). Permitiendo deducir que el Slicing es recomendable para la colecta de ovocitos en este tipo de donantes.

1.1.3.1 Clasificación de CCO's

La clasificación del complejo cúmulus ovocito (CCO), ha sido uno de los métodos más determinantes paación deljTJETBT1 0 00260026>4<003200B60056>] T62 Tm[(>> Bla c)Bla cuno de los mnte

Categoría III: Los CCO's presentan una sola capa de células de cumulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras.

Categoría IV: CCO's desnudos.

Categoría V: CCO's madurados *in vivo*, con cumulo expandido.

Figura 3.

Clasificación de CCO's



Categoría I

Categoría II

Categoría III

Categoría IV

Fuente: Lorenzo, *et al.* (2015).

1.1.4 Maduración *in vitro*.

En este punto del proceso de producción de embriones, se deben proporcionar las condiciones idóneas para que el ovocito madure y se pueda obtener un mayor éxito en la fertilización, ya que permite que los ovocitos adquieran la capacidad de ser fecundados. Como lo señala Moreno, (2018) en este proceso el ovocito avanza de profase a metafase II promoviendo la maduración nuclear, ocurriendo la meiosis.

Según Salgado & Lopera, (2020) se tienen dos sistemas de cultivo para llevar a cabo la maduración *in vitro*, el primero es el sistema cerrado, el cual priva el proceso del contacto con la atmosfera éste ha sido descartado dada su ineficiencia, el segundo sistema es el abierto, en el cual se permite un intercambio gaseoso continuo del ovocito con el ambiente.

Investigaciones señalan que, bajo condiciones ideales alrededor del 95% de los ovocitos llegan a madurarce, y de ellos el 80% puede transformarse al estadio de dos células, aunque, tan solo del 30-50% llega a ser blastocisto 7 días posteriores a la fertilización, Salgado & Lopera, (2020) indica una serie de factores que intervienen en la eficacia del proceso, los cuales se enlistan a continuación;

- a) La técnica de recolección de los CCO's.
- b) La temperatura del ambiente de transporte.
- c) El tiempo transcurrido desde la colecta hasta el laboratorio.
- d) El estadio de desarrollo, ya que los óvulos madurados afectan los resultados de la fertilización.
- e) La duración de la maduración
- f) Finalmente, la composición del medio de maduración y suplementos utilizados.

Prosiguiendo con el último punto, en la maduración *in vitro* se emplean medios de cultivos específicos donde son sumergidos en placas de cultivo y luego, los ovocitos pasan por un período de incubación de 22-24 horas en atmósfera controlada con 5% de CO₂ y 100% de humedad.

1.1.5 Fertilización *in vitro*

Entre los sucesos fisiológicos que ocurren en esta etapa se encuentran, la capacitación y penetración de los espermatozoides, la fusión de las células germinales y la formación de los pronúcleos (Salgado & Lopera, 2020).

Posterior a la maduración de los ovocitos éstos deben entrar en contacto con los espermatozoides, para ello se emplea semen selecto de pajillas congeladas, los espermatozoides son seleccionados según parámetros de calidad, y luego se ajusta la concentración que permitirá fertilizar los ovocitos, por su parte, estos últimos ya madurados son separados en placas de

cultivo y son lavados en gotas con medios para fertilización *in vitro*, para eliminar el medio de cultivo, posteriormente, se agrega gota a gota el semen en una cantidad de 5-10 μl , y, finalmente, se incuba por un periodo de 12-22 horas en un ambiente con las siguientes condiciones 5% CO_2 , 38.9°C de temperatura, y humedad a saturación (Ramírez, 2020). Al igual que la maduración se emplean sistemas abiertos, más usualmente el recubierto.

1.1.6 Clasificación de embriones

De acuerdo con Bó & Mapletoft, (2013), la evaluación de los embriones, generalmente, se realiza con un estereoscopio con un aumento de 50x-100x, se identifican con un diámetro total en un rango de 150 a 190 μm , incluido un grosor de la zona pelúcida de 12 a 15 μm .

Según Colomo (2015), los embriones se pueden clasificar en cuatro grados: según su el número de blastómeros, su estructura, su forma, entre otras.

Grado I: Excelente, no existen defectos notorios. Los blastómeros son claramente visibles, simétricos, de forma esferoide, zona pelúcida está intacta, de color y estructura uniforme, los embriones de este grado sobreviven aceptablemente al proceso de congelación/descongelación y son recomendados para su comercialización (Bó & Mapletoft, 2013).

Grado II: Bueno, el embrión tiene pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y su forma puede ser ligeramente regular, al menos 50% de la masa embrionaria debe conservarse intacta, su sobrevivencia al proceso de congelación/descongelación es menor a la clasificación anterior, sin embargo, sus tasas de preñez son adecuadas si se transfieren en estado fresco, por lo que se clasifican como transferibles, pero no congelables. (Bó & Mapletoft, 2013).

Grado III: Regular, el embrión presenta varios defectos: forma irregular, detritus celular, ligeramente agrietado en la zona pelúcida y color muy claro u oscuro. Estos embriones no sobreviven al procedimiento de congelación/descongelación y las tasas de preñez son menores a las obtenidas con embriones de mejor grado si se transfieren frescos a receptoras idóneas (Bó & Mapletoft, 2013).

Grado IV: Malo, el embrión posee varios defectos: los correspondientes al grado III, sería ruptura de la zona pelúcida, forma asimétrica, desarrollo tardío, vacuolización de los blastómeros. Este grado es considerado no transferible y deben descartarse.

Figura 4.

Clasificación de embriones bovinos en morulas de diferentes grados



Fuente: Bó & Mapletoft, 2013, págs. (346-347)

1.1.7 Criopreservación de embriones

La técnica de crio-preservación de embriones obtenidos por técnicas *in vitro*, obedece al auge de la biotecnología reproductiva y la necesidad de optimizar la recolección de CCO's, disponibilidad de receptoras y oportunidades comerciales para el material genético, lo cual lo convierte en un pilar esencial del mejoramiento genético del hato bovino. Sin embargo, es limitada, ya que solo los embriones grado I, es decir, aquellos de alta calidad, son aptos para la crio-preservación y el logro de tasas de preñez aceptables. En este proceso los embriones son sometidos a bajas temperaturas (-80-196°C), con el propósito de detener su fisiología y preservar sus condiciones por un tiempo determinado.

En dicho proceso, los embriones pueden presentar alteraciones en la estructura de la zona pelúcida, incremento del contenido lípido intracelular y disminución del tamaño y número celular, lo que ha inducido a diferencias en la preñez de las receptoras derivadas por la técnica de producción *in vitro*, sumada con crio- preservación de embriones (Susaño, 2017; Ferré, *et al.* 2020);

Existen varios métodos para la crio-preservación de embriones, entre los que se señalan, congelación convencional y vitrificación, además de la refrigeración.

1.1.7.1 Refrigeración

En este método, se vehiculizan los embriones en una solución Buffer Fosfato (PBS), envasados en pajillas de 0,25ml y refrigerados entre los 0-4°C por un período no mayor a 24 horas (Susaño, 2017).

1.1.7.2 Congelación convencional o lenta.

Controla los aspectos que intervienen en la viabilidad del embrión, tales como, la formación de hielo, el daño osmótico, daño citoesquelético, entre otros. Se emplea un medio de congelación (PBS + Crioprotector) sobre los embriones, se empacan en pajillas y luego, a traviesan una fase

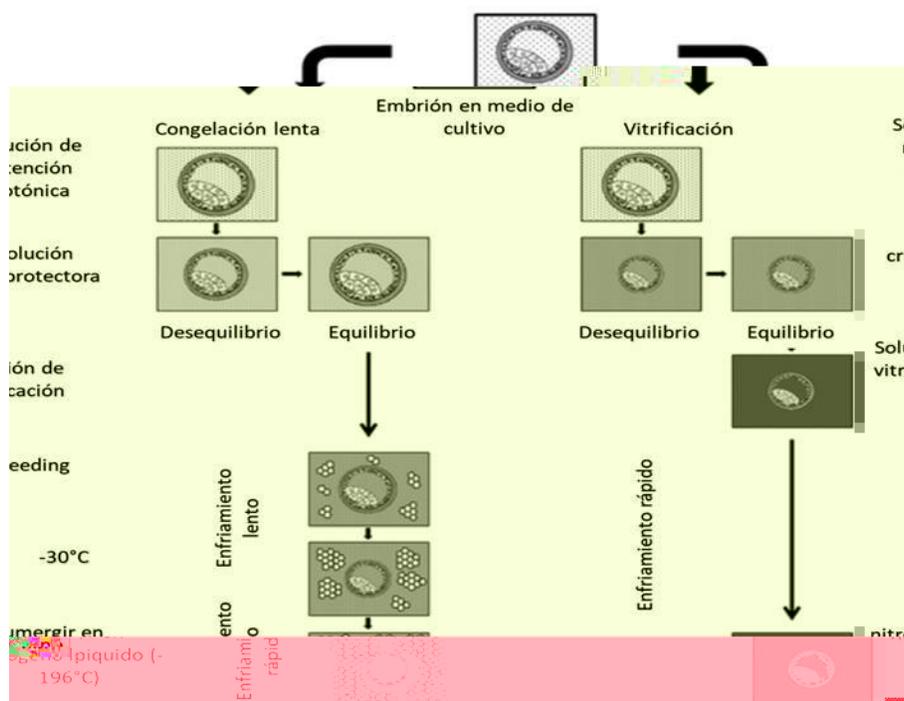
de Seeding o cristalización, con una temperatura de -7°C por 5 minutos. Posteriormente, se mantienen a una temperatura estable por 10 minutos (estabilización) y se desciende paulatinamente de $0,1$ y $0,5^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una temperatura de $30-35^{\circ}\text{C}$, finalmente se almacenan en nitrógeno líquido (-196°C) (Susaño, 2017) (Figura 5).

1.1.7.3 Vitrificación.

En ella se emplean soluciones crio-protectoras altamente concentradas acompañadas de soluciones isotónicas, el contenido al ser enfriado no se cristaliza, se torna viscoso y pasa a un estado sólido no estructurado, parecido al vidrio, por ende, su nombre, (Susaño, 2017). Todo el proceso llega a durar tan solo 10 minutos (Figura 5).

Figura 5.

Representación esquemática de un embrión durante los pasos lentos de congelación y vitrificación.



Nota: El sombreado más oscuro representa una osmolalidad más alta. Los cambios en el tamaño del embrión representan contracción y reexpansión en respuesta a la osmolalidad de la solución y las concentraciones de crio-protectores. Los hexágonos muestran la formación de cristales de hielo.

Fuente: Ferré , Kjelland, Taiyeb, Campos, & Ross, (2020)

1.1.8 Transferencia

En este punto, un factor determinante es la condición de las hembras receptoras, las cuales deben estar libres de afecciones reproductivas, contar con una ciclicidad normal y peso adecuado. La técnica de transferencia comprende la palpación del recto de la receptora con el fin de identificar el cuerpo lúteo que mantendrá la preñez, una vez confirmado, se anestesia para introducir la pajilla con el embrión por medio de una pistola de inseminación (Hafez y Hafez 2000 citado por Sánchez, 2014).

En contraste con los resultados de avance en el desarrollo de tecnologías reproductivas, aún existen diferencias en los reportes de porcentaje de preñez frente al tipo de cultivo empleado durante su maduración, fertilización o congelación, por ello es necesario analizar resultados de estudios realizados en Colombia y en la zona tropical con el fin de determinar la influencia de los medios de cultivo frente a la eficiencia de los embriones producidos a través de técnicas *in vitro*.

Capítulo 2. Medios de cultivos

1.2 Medios de cultivos y avances en la optimización de la maduración de embriones.

Los medios de cultivos en biotecnología reproductiva son una fuente importante en la producción de embriones *in vitro*, estos simulan el ambiente uterino y oviductal en el momento de la liberación de ovocito, la fecundación y el desarrollo embrionario (Sánchez, 2014). Estos se componen principalmente de sales inorgánicas, fuentes energéticas, soluciones amortiguadoras de pH y proteína (Ponce & Rosero, 2020).

Existen medios de cultivo comerciales, algunos de los más comunes son el medio Charles Rosenkrans (CR1), el fluido oviductal sintético (SOF) y el medio optimizado simple de potasio (KSOM) (Ahuja, *et al.* 2009), también hay otros medios más complejos como el TCM-199, sin embargo, como señala Bonilla *et al.*, (2021) a pesar de la optimización de estos tópicos difícilmente superan más del 40% en tasas de blastocitos.

Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente la información disponible sobre estudios realizados en Colombia de producción de embriones bovinos y más aún, medios de cultivo es limitada, a continuación, se exponen algunos resultados obtenidos por diferentes autores sobre la comparación entre medios de cultivo y diferentes suplementos empleados para aumentar el rendimiento de la producción de embriones.

El TCM-199, es conocido por ser el medio más utilizado en la maduración ovocitaria, se compone de sales Earle's con solución de bicarbonato, piruvato, lactato, vitaminas, aminoácidos, purinas y proteínas como la albúmina o el suero bovino (Ferré, 2017). En un estudio realizado en Perú, se evaluaron los medios de maduración *in vitro* en ganado *Bos taurus*, comparando Líquido Folicular + LH y el medio sintético TCM-199, se encontró que este último obtuvo mejores resultados, alcanzando hasta un 44,73% de maduración versus el 31,71% del Líquido Folicular +

LH, de igual forma Lino *et al.*, (2021) señalaron que en una evaluación del medio TCM-199 versus Minitube frente a la maduración ovocitaria, el medio de cultivo TCM-199 permitió obtener mayor porcentaje de ovocitos madurados, idóneos para los procesos de incubación y, por ende, mayor probabilidad de porcentaje de embriones.

Por su parte, en otros estudios se ha evaluado la temperatura de maduración ovocitaria presentando mejores resultados cuando esta ocurre en medio TCM-199 durante 22 horas en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en el aire a 36,5 ° C en conjunto con el medio de cultivo de embriones SOFaa suplementado con antioxidantes (una mezcla de L-glutatión reducido 1 mM y 1.500 UI de superóxido dismutasa), lo cual indujo a un aumento ($p < 0.05$) en el número de células de masa celular interna compacta en blastocistos de ovocitos de grado I (Sen & Kuran, 2018).

Ya que el embrión pasa por una serie de cambios en sus requisitos durante el desarrollo embrionario, la aplicación de medios de cultivo con formulaciones similares al ambiente del tracto reproductivo durante el crecimiento del embrión previo a su transferencia es una estrategia viable. Camargo *et al.* (2016), señalan que el medio de cultivo KSOM hasta el tercer día post fertilización en adición de 1 mg/ml de BSA, seguido de SOF con 10mg/ml de BSA, incrementó la tasa de blastocistos y el número de células.

Un estudio comparó el empleo de dos medios en el cultivo de embriones, fluido de oviducto sintético (SOF) y medio de potasio simple optimizado (KSOM), el proceso inició desde la maduración de los ovocitos con el medio TCM-199 durante 24 ha 39 ° C, 5% de CO₂ y alta humedad, posteriormente, ocurrió la fertilización con una concentración de $1,5 \times 10^6$ espermatozoides por ml en medio TALP durante 18 ha 39 ° C, 5% de CO₂ y alta humedad. La aplicación de los tratamientos consistió en el cultivo de los cigotos asignados al azar a los medios

SOF o KSOM, cultivados a 39 ° C, 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ y alta humedad durante 9 días, el cultivo SOF mostró mejores resultados en cuanto al porcentaje de blastocistos al día 9, obteniendo 25,6% frente a 18,9% del medio KSOM, así mismo, los porcentajes de blastocistos eclosionados y expandidos desarrollados fueron superiores para el medio SOF (P <0,05); 128,8 ± 7,5 medio SOF frente a 84,3 ± 8,9 medio KSOM (Zapata, *et al.* 2009).

Hamdi, *et al.* (2017), probaron la suplementación con fluidos uterinos y oviductales en adición al medio SOF versus la suplementación con BSA o FCS (Grupos control), encontraron que una suplementación con 2,5% o 1,25% de fluido uterino obtuvo rendimientos de blastocistos en el día 9 similares a los observados en los dos controles, mientras que en la supervivencia a la vitrificación el mayor rendimiento correspondió al medio SOF + BSA (Control), sin embargo los grupos OF + UF tuvieron la segunda tasa de supervivencia más alta. Concluyeron que la suplementación otorgó un mejor control de la metilación del embrión y capacidad antioxidante en los grupos.

Otros autores, midieron el efecto de la suplementación con Cisteamina en los medios KSOM y SOF, ante el estrés oxidativo y la supervivencia de los embriones, los CCO's provenientes de una planta de sacrificio en Perú, fueron seleccionados y madurados con el medio TCM-199, los tratamientos consistieron en la adición o no de 100 mM de cisteamina al medio de maduración ovocitaria, luego, posterior a la fecundación, los dos grupos de cigotos (con y sin cisteamina) se separaron para cada grupo de medio de cultivo de embriones, los grupos de estudio fueron los siguientes: G1: Maduración TCM 199 + Cultivo KSOM_{aa}, G2: Maduración TCM 199 + Cultivo KOM_{aa} + SOF, G3: Maduración TCM 199 + Cisteamina + Cultivo KSOM_{aa}, y G4: Maduración TCM 199 + Cisteamina + Cultivo KSOM_{aa} + SOF, se cultivaron hasta el día 8 en cámaras individuales. Se encontraron diferencias estadísticas en la adición de cisteamina como

suplementación del medio de desarrollo ovocitario en la tasa de blastocistos obtenidos al día 8 post cultivo, ($p < 0.05$), siendo superior en los grupos 3 y 4 (Quintanilla, *et al.* 2015). Se determinó que, la adición de cisteamina en el medio de maduración otorga capacidad de protección antioxidante. Otro aditivo antioxidante estudiado en Colombia ha sido el extracto de moringa (*Moringa oleífera*), el cual, de acuerdo con Amaya, (2021), al ser añadido al medio de cultivo de oocitos TCM-199 en una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ redujó en un 57% los niveles de especies reactivas al oxígeno (EROs).

Otro aditivo interesante ha sido el YM976 (4- (3-clorofenil) -1,7-dietilpirido [2,3- d] pirimidin-2 (1 H)-ona), destacado por sus cualidades antioxidantes y antiinflamatorias, además de ser un inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo 4 (PDE-4), una investigación realizada en Sincelejo, Colombia, determinó que cuando es añadido a concentraciones de 1 y 10nM durante la maduración *in vitro* de oocitos en el medio TCM-199 evidencia una maduración nuclear y competencia de las células, reemplazando la acción de las hormonas LH y FSH (Carrillo *et al.*, 2021).

En otro estudio, se determinó la influencia de cisteamina en adición de péptido natriurético de tipo C (CNP) frente a la eficiencia de la producción de embriones *in vitro*, se evaluó el porcentaje de blastocistos obtenidos y EROs, se evidenciaron diferencias estadísticas en la tasa de blastocistos escindido con la adición de CNP en el proceso de maduración de ovocitos ($P < 0.05$), siendo el grupo superior aquel que fue suplementado, lo que sugiere que el uso de CNP combinado con cisteamina durante la maduración de ovocitos sería beneficioso, ya que logra mejorar el potencial de desarrollo de los ovocitos bovinos madurados *in vitro* (Zhenwei & Xianhua, 2019).

Las experiencias con el uso del medio de cultivo CR1-aa señalan que este ha sido menos eficiente en relación a otros medios comerciales. En un estudio realizado en Antioquia, se emplearon CCO's grado I, madurados en el medio TCM-199 suplementado con 10% de SBF, FSH, LH, estradiol y ácido pirúvico. Los medios evaluados fueron CR1-aa (preparado en laboratorio) y KSOMaa (comercial, Zenith Biotech ZEHG-050) para el cultivo de embriones, se evaluó la división celular el día 3 y la tasa de mórulas y blastocistos en el día 7. Se encontraron diferencias en las variables evaluadas, siendo la tasa de clivaje superior en KSOMaa frente a CR1aa (83% vs 44%), igualmente, el número de blastocistos producidos fue de 15% y 0%, respectivamente. Los autores relacionan las diferencias en los resultados con la composición del medio preparado en laboratorio. Por su parte, López et al., (2007) encontraron que el medio de cultivo CR1aa puede ser optimizado cuando se realiza incubación en presencia de células oviductales en oxígeno al 20%, obteniendo tasas de clivaje a las 48hpi, dada la reducción de las especies reactivas al oxígeno. De igual forma, Sánchez, (2014) reporta mayor eficiencia con el medio SOF, frente al medio CR1aa ($P \leq 0.05$), 78.0% de embriones obtenidos por el medio SOF frente a 43.8% de embriones obtenidos del medio CR1aa.

También, se han evaluado suplementos en medios de cultivo con el fin de determinar su efecto en embriones congelados, ese es el caso de la adición de vesículas extracelulares oviductales (oEV) extraídas de uteros de planta de sacrificio, por su parte, ovocitos fertilizados y madurados en medio SOF+ BSA fueron suplementados en diferentes dosis de oEV, encontrándose que en una dosis de 0,05mg/ml se observa una tendencia en la mejora de la tasa de blastocistos expandidos de grado 1 al día 7 en embriones frescos, mientras que en embriones criopreservados no se observaron efectos en la misma variable (Le Bourhis, *et al.* 2019).

Conclusión

La producción de embriones *in vitro* se ha masificado en los últimos años en el continente, varios países han mostrado índices positivos en la adopción de la técnica, a pesar de que en Colombia la información sobre la utilización y comparación de medios de cultivo sea limitante, los reportes disponibles permiten inferir que la investigación ha permitido optimizar la técnica de forma que el empleo de diferentes aditivos sea más rentable y permita mejores resultados en la supervivencia de los embriones en base a efectos antioxidantes, todo esto considerando la fisiología de estos eventos ocurridos en los cruces de interés para la región sometidos a las condiciones del trópico.

Referencias

- Aguilar, R. (2019). Efecto de dos protocolos de superovulación en cantidad y calidad de embriones bovinos producidos in vivo. *Trabajo de grado*. Perú: Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.
- Ahuja, C., Montiel, F., Pérez, P., & Gallegos, J. (2009). Medio alternativo para la producción in vitro de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*.
- Amaya, L. (2021). Efecto antioxidante del extracto de Moringa oleifera en la maduración in vitro de oocitos bovinos. *Trabajo de grado*. Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- ASOCEBÚ COLOMBIA. (2021). *La raza Gyr especializada en leche*. Obtenido de <https://www.asocebu.com/index.php/razas/gyr#gyr-en-colombia>
- Bernal, Beatriz. (2016). Influencia de la suplementación del medio de maduración y de cultivo en la supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos *in vitro*. Universidad nacional de córdoba facultad de ciencias agropecuarias escuela para graduados. Instituto de reproducción animal córdoba (IRAC).
- Betancourth, J.; Cáceres, G. (2011). Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria / Zamorano, Honduras.
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2013). Evaluación y clasificación de embriones bovinos. *Animal reproduction*, 344-348.
- Bonilla, R. (2012). Captación de óvulos en el ganado: un análisis retrospectivo de 25 años. *Animal Reproduction*, 362-369.

Bonilla, L., Bonilla, D., & Gómez, R. (2021). Production of bovine embryos from the invitros Colombia laboratory durinf 2019. *Workinf Papers ECAPMA*, 6-16.

Bonilla, L., Mejía , A., Gómez, R., Torres, M., & Uribe, F. (2018). Viabilidad y tasa de preñez de embriones producidos in vitro a partir de semen sexado comparado con semen convencional en Bos taurus y Bos indicus. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 1377-1385.

- Contreras, S. E. (2017). Evaluación de diferentes metodologías de sincronización de la onda folicular y la ovulación sobre la eficiencia reproductiva en hembras bovinas doble propósito. *Trabajo de grado*. Fusagasugá, Colombia: Universidad de Cundinamarca.
- Gstir, E. (2010). Efecto de la aplicación de la FSH y LH en un protocolo de sincronización de la ovulación sobre la tasa de preñez en ganado bovino brahmán. Universidad Nacional Agraria de la Selva.,
- FEDEGAN. (2020). *Cifras de referencia del sector ganadero colombiano*. Obtenido de Federación Colombiana de Ganaderos: <https://www.fedegan.org.co/estadisticas/general>
- Ferré , L., Kjelland, M., Taiyeb, A., Campos, F., & Ross, P. (2020). Avances recientes en la criolerancia de embriones derivados in vitro de bovinos: impacto de los sistemas de cultivo in vitro, avances en la criopreservación y consideraciones futuras. *Reproducción en animales domésticos*, 659-676.
- Ferré, L. (2017). Nuevas estrategias para mejorar la eficiencia del semen sexado en producción in vitro de embriones bovinos. *Tesis de doctorado*. Argentina: Universidad Nacional del Litoral.
- Hamdi, M., Lopera, R., Maillo, V., Sanchez, M., Núñez, C., Gutiérrez, A., & Rizos, D. (2017). Los fluidos uterinos y oviductal bovinos apoyan el desarrollo embrionario in vitro. *Reproducción, fertilidad y desarrollo* , 935-945.
- Hufana, D., & Duran, P. (2020). Estrategias de reproducción animal para la producción ganadera sostenible en los trópicos. *The 2nd International Conference of Animal Science and Technology* (págs. 1-18). Ciudad de Muñoz: Earth Environ.

- Le Bourhis, D., Janati, S., Mermillod, P., Carmen, A., Palvetti, P., & Saint Dizier, M. (2019). Efecto de la suplementación con vesículas extracelulares de líquido oviductal durante el cultivo in vitro sobre el desarrollo y la calidad de embriones bovinos. *Reproducción, fertilidad y desarrollo* , 158-158.
- Lino , A., Chasi, B., Hincapié, J., & Castillo, R. (2021). Efecto de dos medios de maduración sobre la producción de embriones partenogénicos en bovinos. *Trabajo de grado*. Honduras: Zamorano.
- Lenis, Y.; Olivera, M.; Tarazona, A. (2013). Efecto del ácido linoleico sobre la producción de las prostaglandinas PGF2 α y PGE2 en células endometriales. *Revista MVZ Córdoba / Volumen 18 / Número 2*.
- Lliteras, R.; Denis, R.; Chong, M.; Bernal, A.; Fuentes, D. (2007). Inhibina: una alternativa para mejorar los resultados del tratamiento superovulatorio. *Comunicación. Ciencia y Tecnología Ganadera / Volumen 1 / Numero 3 p. 111-114*
- López, C., Olivera, M., Ruiz, T., & Tarazona, A. (2007). Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embiones bovinos producidos in vitro. *Revista MVZ Córdoba*, 1061-1067.
- Lorenzo, M., Tello, M., Fischman, M., Claver, J., & Lombardo, D. (2015). Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cumulus ovocito porcinos. *InVet*, 25-34.
- Mapletoft, R. J. (2013). Historia y perspectivas de la transferencia de embriones bovinos. *Animal Reproduction*, 168-173.
- Mauri, A. (2017). Maduración de ovocitos y desarrollo de embriones bovinos cocultivados en monocapas celulares. *Tesis doctoral*. Argentina: Universidad de Buenos Aires.

- Medina, F. L., & Tovar, L. M. (2021). Desarrollo y regulación genética en embriones tempranos bovinos. *Trabajo de grado*. Colombia: Universidad Cooperativa de Colombia.
- Molina, R., Herrera, J., Arroyo, C., & Carballo, D. (2020). Experiencias en el uso de la transferencia de embriones para crear un hato Girolando en Pococí, Costa Rica. *Nutrición Animal Tropical*, 187-208.
- Moreira, J., Silva, A., Ribeiro, R., & Bruno, L. (2018). Una perspectiva histórica de las tecnologías relacionadas con la producción de embriones en América del Sur. *Animal Reproduction*, 963-970.
- Moreno, D. (2018). Estado actual, proyecciones y perspectivas de la fertilización in vitro (FIV) en la ganadería bovina en Colombia. *Trabajo de grado*. Tunja, Colombia: Universidad Nacional abierta y a distancia-UNAD.
- Narváez, H. (2020). Efecto del grupo genético de vacas de las razas Gyry Holstein sobre la técnica de producción in vitro de embriones bovinos. *Fisiología Animal*, 1-10.
- Oyuela, L., & Jiménez, C. (2010). FACTORES QUE AFECTAN LA TASA DE PREÑEZ EN PROGRAMAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES. *Revistas UNAL*.
- Ponce, K., & Rosero, K. (2020). Efecto de la suplementación con cafeína en el medio de fertilización sobre la producción in vitro de embriones bovinos. *Tesis de grado*. Honduras : Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Quintanilla, L., Huanca, W., Córdova, A., Ampuero, A., & Benavides, L. (2015). Efecto de la Suplementación del Medio de Maduración con Cisteamina y de Dos Medios de Cultivo

(KSOMaa y SOF) en la Fecundación in vitro de Ovocitos Bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 462-468.

Ramírez, J. (Noviembre de 2020). Formación en producción in vitro de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia. *Trabajo de grado*. Medellín, Colombia: Universidad CES.

Salgado, E., & Lopera, R. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17-38.

Sampaio Baruselli, P., Henryli de Souza, A., de Sá Filho, M., Oliveira Marques, M., & de Sousa Sales, J. (2018). Genetic market in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP): financial payback based on reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Animal Reproduction*, 247-255.

- Sen, U., & Kuran, M. (2018). La baja temperatura de incubación apoya con éxito la maduración de los ovocitos bovinos in vitro y el desarrollo posterior de los embriones. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 827–834}.
- Susaño, R. (2017). Evaluacion de la viabilidad de embriones producidos in vitro de ganado bovino al proceso de congelacion y vitrificacion en condiciones de altura. *Tesis doctoral*. Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Zapata, J., Fernandez, F., Berland, M., Colazo, M., Peralta, O., Felmer, R., & M, R. (2009). EFECTO DEL MEDIO DE FLUIDO DE OVIDUCTO SINTÉTICO (SOF) versus MEDIO DE POTASIO SIMPLE OPTIMIZADO (KSOM) EN EL DESARROLLO DE EMBRIONES DE OOCÍTOS BOVINOS FERTILIZADOS IN VITRO. *Reproducción, fertilidad y desarrollo*, 308-312.
- Zhenwei, J., & Xianhua, Z. (2019). El tratamiento previo a la IVM con péptido natriurético de tipo C en presencia de cisteamina mejora la capacidad de defensa antioxidante de los ovocitos bovinos y su capacidad de desarrollo in vitro. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 173-179.