

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



“Colección de ovocitos por la técnica de OPU para la producción de embriones *in vitro* en vacas Holstein en diferentes condiciones ambientales”

Por:

ARACELY FIGUEROA QUIROZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Diciembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

"Colección de ovocitos por la técnica de OPU para la producción de embriones *in vitro* en vacas Holstein en diferentes condiciones ambientales"

Por:

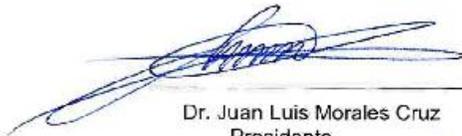
ARACELY FIGUEROA QUIROZ

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:


Dr. Juan Luis Morales Cruz
Presidente


Dr. Óscar Ángel García
Vocal


Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz
Vocal


MC. Bertha Eustolia Pereda Espinoza
Vocal Suplente


MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal
Torreón, Coahuila, México
Diciembre, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

"Colección de ovocitos por la técnica de OPU para la producción de embriones *in vitro* en vacas Holstein en diferentes condiciones ambientales"

Por:

ARACELY FIGUEROA QUIROZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Juan Luis Morales Cruz
Asesor Principal


MC. Bertha Eustolia Pereda Espinoza
Coasesor externo


Dr. Oscar Ángel García
Coasesor


Dr. Juan Manuel Guillén Muñoz
Coasesor


MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal
Torreón, Coahuila, México
Diciembre, 2021



Agradecimientos.

A mis padres, agradezco el amor incondicional que me permite día con día superarme más, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme, este logro es suyo. A mi Mabel, gracias hermana por desvelarte junto conmigo y jamás jamás dejarme sola como mazorca. A Rosy y a Juan, gracias por ser quienes son, por creer en mí siempre, por su apoyo y cariño incondicional.

A Roberto C. por enseñarme que los sueños se hacen realidad con amor y paciencia.

A mi amiga Mariana, por siempre encontrar las palabras adecuadas para animarme, a todos mis amigos de carrera.

Al Dr. Juan Luis M. y todo el equipo del C.B.R. por compartir un poquito de todo lo que saben.

A mi laptop SONY por aguantar taaantos años y todavía tener valor de hacer una tesis.

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la producción ovocitaria para la producción de embriones *in vitro* durante temporada de calor (otoño) y frío (invierno). Este estudio fue desarrollado en la Comarca Lagunera de México, con ganado de raza Holstein Friesian, el cual se encontraba en un sistema estabulado. Se utilizaron 94 vacas como donadoras de ovocitos las cuales se dividieron en 2 grupos experimentales de acuerdo a la temporada de aspiración folicular (calor n= 49; frío n= 45). Las variables que evaluaron fueron: la competencia de los ovocitos aspirados y seleccionados para cultivo, considerando como éxito en la primera variable el clivaje de un embrión y en la segunda la obtención de un embrión transferible. Se pudo observar una diferencia significativa entre las dos temporadas de aspiración de ovocitos, teniendo una respuesta favorable en la temporada de frío tanto para llegar a la etapa de clivaje (38% en calor; 60% en frío, $P<0.001$), como para llegar a la etapa de un blastocito con potencial para ser transferido o congelado (8% en calor; 15% en frío, $P<0.001$). Teniendo como resultado que los ovocitos aspirados en temporada de frío obtuvieron una mejor respuesta tanto en clivaje como en embriones producidos, en comparación con los aspirados en temporada de calor. Se concluye que la temporada de calor afectó negativamente la calidad ovocitaria y la producción de embriones *in vitro*, mientras que en la temporada de frío se obtuvieron los mejores porcentajes de producción embrionaria.

Palabras claves: Vaca Holstein, Ovocitos, Producción de embriones, *in vitro*, Temporada,

Contenido

Agradecimientos.....	i
Resumen.....	ii
Índice de Cuadros.....	iv
Introducción.....	1
II Objetivo.....	3
III Revisión de literatura.....	4
3.1 Efecto del ambiente sobre la fertilidad en el ganado lechero.....	4
3.2 Ventajas y desventajas de la producción de embriones <i>in vitro</i>	6
3.3 Selección y manejo de vacas donadoras de ovocitos.....	7
3.4 Selección y manejo de vacas receptoras de embriones.....	9
3.5 Principales métodos de colección de ovocitos.....	10
3.5.1 Aspiración de ovarios de rastro.....	11
3.5.2 Aspiración folicular <i>in vivo</i> guiada por ecografía (OPU).....	12
3.6 Importancia de la calidad ovocitaria para la producción de embriones <i>in vitro</i> de embriones.....	14
3.7 Evaluación de la calidad ovocitaria.....	15
3.8 Producción de embriones <i>in vitro</i>	16
3.8.1 Maduración de embriones <i>in vitro</i>	17
3.8.2 Fertilización <i>in vitro</i>	19
3.9 Evaluación de la calidad embrionaria.....	20
IV Materiales y métodos.....	23
4.1 Selección de donadoras.....	23
4.2 Diseño del experimento.....	25
4.3 Variables analizadas.....	25
4.4 Análisis estadístico.....	25
V Resultados.....	26
VI Discusión.....	27
VII Conclusiones.....	29
VIII Recomendaciones.....	29
IX Literatura citada.....	30

Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Aspiración de ovocitos y producción de embriones <i>in vitro</i>	25
Cuadro 2. Colección de ovocitos y producción embrionaria <i>in vitro</i> en vacas Holstein en temporada de calor y frío.	26

Introducción.

La producción de embriones *in vitro* es una de las biotecnologías que se utiliza para el mejoramiento genético y más recientemente en algunos hatos como parte del manejo reproductivo. El impacto favorable en la productividad de los hatos ganaderos de esta biotecnología depende de la calidad de las células que se obtienen de vacas donadoras de ovocitos las cuales deben ser vacas sanas y de alto valor genético.

Las técnicas para obtener los ovocitos de las vacas principalmente son la recolección de ovarios de rastro y la aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía, siendo esta última la más eficiente por poder realizar repeticiones del proceso, esta técnica fue desarrollada originalmente para la reproducción asistida en la especie humana, fue usada por primera vez en Holanda, en ganado vacuno en la década de los 80`s. El empleo de OPU de forma rutinaria en reproducción asistida veterinaria se inicia en 1994 (Kruip *et al.*, 1994).

La OPU es una técnica con amplias posibilidades, puede ser utilizada en vacas adultas en distintos estados fisiológicos: cíclicas, no cíclicas, animales en gestación, incluso en aquellas que no responden a estímulos hormonales, animales de edad avanzada y animales jóvenes (Galli, *et al.*, 2001). La recuperación de ovocitos mediante esta técnica permite obtener la mayor descendencia posible de animales con alto valor genético, acelerar los procesos de selección y mejora animal vía paterna y materna (Ding *et al.*, 2008).

El ganado Holstein es altamente susceptible a las altas temperaturas, uno de los efectos negativos más notables del estrés calórico está en la reducción de la fertilidad cuando el ganado se encuentra en climas cálidos o durante las épocas del año donde se registran mayores temperaturas. El porcentaje de concepción llega a caer de 40% en meses templados o fríos, hasta un 15% durante el verano (Aréchiga , *et al.*, 1998).

La región lagunera presentó en el 2020 (año del estudio) una temperatura promedio de 29.7°C es importante recordar que la zona de confort térmico de la raza Holstein va desde los 0°C hasta los 25°C, el rendimiento de las vacas disminuye rápidamente a medida que la temperatura supera los 27°C, independientemente del estado físico de la vaca (Kadzere, *et al.*, 2002).

A pesar de que en este sistema de producción se utilizan herramientas biotecnológicas de manera rutinaria como la inseminación, los reportes de investigaciones en la literatura sobre la producción de embriones *in vitro* en las diferentes temporadas (frío y calor) son escasos.

Es por lo anterior y a pesar de los cuidados y confort que se les pueda dar a los animales, el ambiente al que están expuestas las vacas en las diferentes estaciones tiene un papel importante en la calidad y competencia de las células germinales, es por esto que se considera importante evaluar que condiciones ambientales o temporada es mejor para aspirar ovocitos por medio de la técnica de OPU y que sirvan para la producción de embriones *in vitro*.

II Objetivo.

Evaluar la producción ovocitaria para la producción de embriones *in vitro* en diferentes condiciones ambientales (calor y frío).

III Revisión de literatura

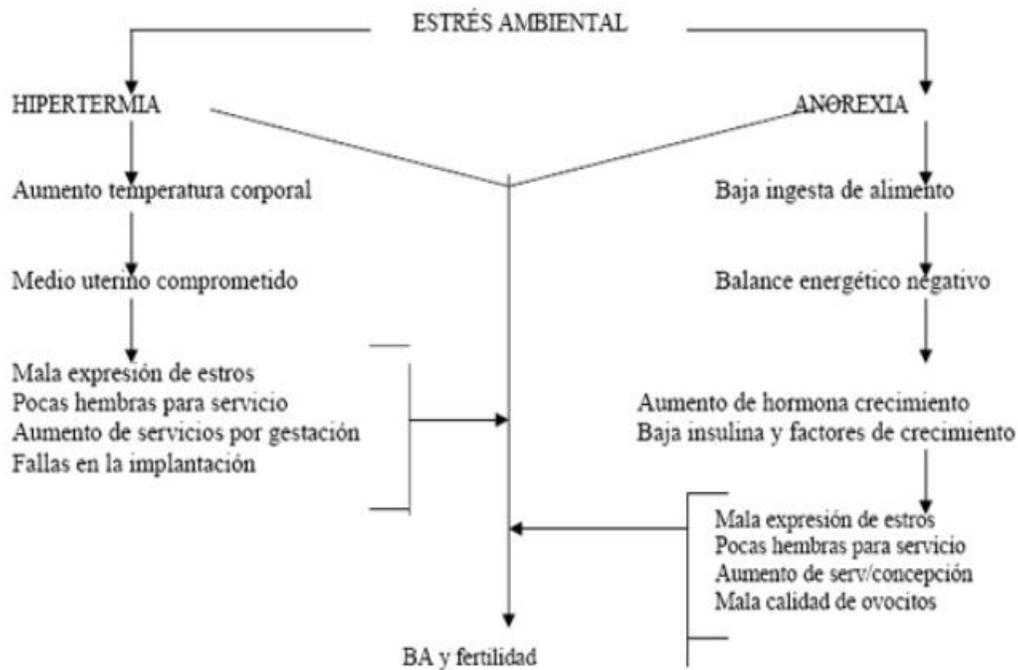
3.1 Efecto del ambiente sobre la fertilidad en el ganado lechero.

De acuerdo con Pulido (2011) el bovino de leche de raza Holstein, es un organismo homeotermo que mantiene su temperatura constante de 38.4 a 39 °C, sin embargo, el organismo no es independiente del medio ambiente. Es crucial entender la importancia que ejerce el ambiente sobre el animal, para esto es necesario recordar que el estado de confort o zona termoneutral de la raza aquí estudiada es de -5 a 16°C. Sin embargo, esta zona de confort se ve expuesta a una temperatura arriba de 24°C.

El ciclo estral es un evento fisiológico sensible al estrés, casi siempre ocasionado por las altas temperaturas, esto disminuye la intensidad y duración del celo y tiene efectos sumamente importantes sobre la fertilidad, principalmente en animales con problemas de adaptación a las condiciones ambientales, el estrés calórico afecta el comportamiento sexual, la fertilidad, folculogénesis, ovulación función lútea e implantación (Sheen y Riesco, 2002)

Según Columbiano (2007) el estrés calórico es la fuerza ejercida por los componentes del ambiente térmico sobre el organismo, causando en él una reacción fisiológica proporcional a la intensidad de la fuerza aplicada del organismo en compensar las desviaciones causadas por esta fuerza.

Figura 1. Estrés ambiental (Tomada de González, 2000).



Además, el estrés calórico causa una reducción del flujo sanguíneo al útero, el cual se asocia directamente con una alteración de la disponibilidad de agua, nutrientes y hormonas en esta región; Disminuye la disipación del calor aumentando así la temperatura uterina, afectando al ovulo fertilizado, embrión en desarrollo, al espermatozoide, crecimiento fetal, alteración de la funcionalidad de la placenta y la función endocrina (Buestan-Carabajo, 2011).

La hipertermia provoca una disminución en la función celular de varios tejidos del tracto reproductivo de la hembra bovina, teniendo consecuencias negativas sobre la secreción hormonal, desarrollo embrionario e incluso generando daños al propio ovocito, que son las estructuras más sensibles. No se conocen exactamente los mecanismos mediante los cuales se generan dichos daños, pero se cree que son causados al aumento de la actividad apoptótica y producción de especies de

oxígeno reactivas (ROS) en los comportamientos citoplasmáticos y nucleares a nivel celular (Roth, 2015).

Como menciona Maquez, *et al.*, (2015) los ovocitos pueden verse afectados directamente a consecuencia de las altas temperaturas o por repercusiones generadas en el desarrollo folicular que pudiera comprometer su calidad.

Los ovocitos se ven perjudicados si el choque térmico ocurre después de las primeras 12h de maduración ovocitaria, es aquí cuando el desarrollo al estadio de blastocito se ve comprometido, afectando la maduración nuclear y su tasa de fertilidad. Las células de cumulus, tal vez cumplan una función termoprotectora, mediada por la capacidad que poseen de secretar proteínas de choque térmico (HSP-70), desde el estadio de desarrollo de 2 células (Arechiga y Hansen, 2003).

3.2 Ventajas y desventajas de la producción de embriones *in vitro*.

El proceso para el cultivo de embriones *in vitro* posee una serie de pasos como son la obtención y maduración de los ovocitos, la fertilización de los mismos y finalmente la maduración de los embriones. Esta clase de sistemas deben asegurar que el ovocito resultante complete de forma “normal” su desarrollo y este sea capaz de ser fecundado, dando origen a un cigoto competente que logre continuar su desarrollo luego de ser transferido (Díaz-Pazmiño y Hurtado-Bernal, 2010).

La producción de embriones *in vitro* comprende un conjunto de técnicas para la multiplicación en condiciones de laboratorio de líneas de animales genéticamente

superiores. El desarrollo de estas biotecnologías se basa en el avance de las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones.

Para lograr los objetivos de esta biotecnología es vital contar con el laboratorio, equipo y protocolos adecuados que garanticen la simulación de las condiciones naturales de desarrollo de los embriones en la madre. La producción de *embriones consta de tres etapas: Maduración in vitro* (MIV), *Fecundación in vitro* (FIV) y *Cultivo in vitro* (CIV) de los posibles cigotos, esto con el único fin de obtener blastocistos de alta calidad (Fernández.- *et al.*, 2007; Salgado-Cruz y Lopera-Vásquez, 2020)

La producción de embriones *in vitro* promueve la evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos, ayuda a la difusión del uso de semen valioso y escaso y al control de enfermedades de la esfera reproductiva entre otras (Ramírez-Orozco, 2020). Según Wetscher (2005) se tiene conocimiento de que los embriones producidos *in vivo* tienen mayor calidad que los producidos *in vitro*, dando como resultado una limitación comercial, sobre todo en los rangos de crío supervivencia debido a que los embriones producidos en laboratorio tienen mayor cantidad de gotas de lípidos intracelulares (esto causa degeneración del embrión post-congelación) a esto se agrega la gran posibilidad de sufrir apoptosis.

3.3 Selección y manejo de vacas donadoras de ovocitos.

La selección de las vacas donadoras se rige por distintos criterios, para esto deben tomarse en cuenta varios factores, tales como genética (las donadoras deben poseer las mejores características fenotípicas de la raza), capacidad reproductiva, número de partos, días abiertos, condición corporal, estado de salud general. Se

realiza un examen anatómico mediante palpación transrectal y/o ecografía, esto con el objetivo de descartar cualquier anomalía estructural.



Figura 2.
Características de la
hembra donadora

(Tomada de Tribulo 2021).

Los protocolos de sincronización se han utilizado diversos tratamientos a base de progesterona o progestágenos, en distintas presentaciones y métodos de aplicación, generalmente combinados con otras hormonas. Los protocolos de sincronización donde se usa CIDR comprenden periodos de inserción que pueden durar de 7 a 10 días. La aplicación de compuestos hormonales tales como el estradiol, benzoato de estradiol y cipionato de estradiol, al iniciar el protocolo, pueden provocar la lisis de cuerpos lúteos en formación, además de que inducen la terminación de la oleada de crecimiento folicular que se encuentre en curso, logrando así la una nueva oleada de crecimiento folicular 3 o 4 días después (Cleeff, *et al.*, 1992).

3.4 Selección y manejo de vacas receptoras de embriones.

La receptora ideal es una vaca joven, libre de enfermedades, de probada fertilidad, con tamaño adecuado para no presentar problemas al parto. Según Britos-Cano, *et al.* (2020) la selección de receptoras es crucial para el éxito de la transferencia, es importante evaluar distintos aspectos, tales como: condición corporal, ≥ 3 , esto en una escala de 1 al 5, ausencia de preñez, cíclicas, ausencia de enfermedades clínicas aparentes. En caso de vacas receptoras, deben haber tenido 1 a 2 partos y estar dentro de un periodo postparto no menor a 90 días, con involución uterina completa y libre de enfermedades.

Es de particular importancia en la sincronización de receptoras, un mayor control en cuanto al grado de sincronización de los estros, además de asegurar una función lútea posterior al estro sincronizado, adecuada para la supervivencia del embrión transferido (Hasler, 1992).

Una sincronización del estro a base de progestágenos con protocolos de larga duración, aumenta la eficacia en la sincronía y la proporción de animales en estro durante el periodo de sincronización, logrando con esto hasta un 90% de animales en estro en las primeras 48 h. postratamiento (Macmillan *et al.*, 1993).

3.5 Principales métodos de colección de ovocitos.

La herramienta más adecuada para implantar genética en una unidad de producción son las biotecnologías reproductivas, grandes avances en los procedimientos van dirigidos a la reproducción asistida en humanos y al mejoramiento en la manipulación reproductiva y genética de los animales. La aplicación de la FIV, en la reproducción bovina se han incrementado en los últimos años y ya son utilizados en programas de gran escala de producción comercial. Existen varias técnicas utilizadas para la recolección de ovocitos.

3.5.1 Aspiración de ovarios de rastro.

La obtención de ovarios provenientes de vacas sacrificadas en el matadero suministra una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo, estos ovocitos provienen de animales en diferentes estados de ciclo estral, dando la oportunidad de ser aprovechados. Se pueden obtener entre 15-20 ovocitos, lo que permitiría obtener entre 4-6 ovocitos viables para transferencia.

El transporte de los ovarios debe ser en una solución fisiológica buffer, Phosphate Buffer Saline o PBS, adicionada con antibiótico, la temperatura debe mantenerse entre los 24-25°C (Palma, 2008).

Una vez en el laboratorio, se procede a lavarlos 3 veces en el medio. Si no cuenta con el equipo adecuado, es posible aspirar los oocitos con una jeringa de 5ml con la cual se genera un vacío adecuado (Díaz-Pazmiño y Hurtado-Bernal, 2010).

Se puncionan todos los folículos terciarios visibles que posean un tamaño comprendido entre 2-6 mm, luego, el líquido folicular con los oocitos se deja sedimentar aproximadamente 15-20 minutos, en solución, antes de aislar los complejos cumulos-ooocito. Posteriormente deben ser lavados 2 veces para que sea posible clasificar a los ovocitos morfológicamente (SUSS, 1987).

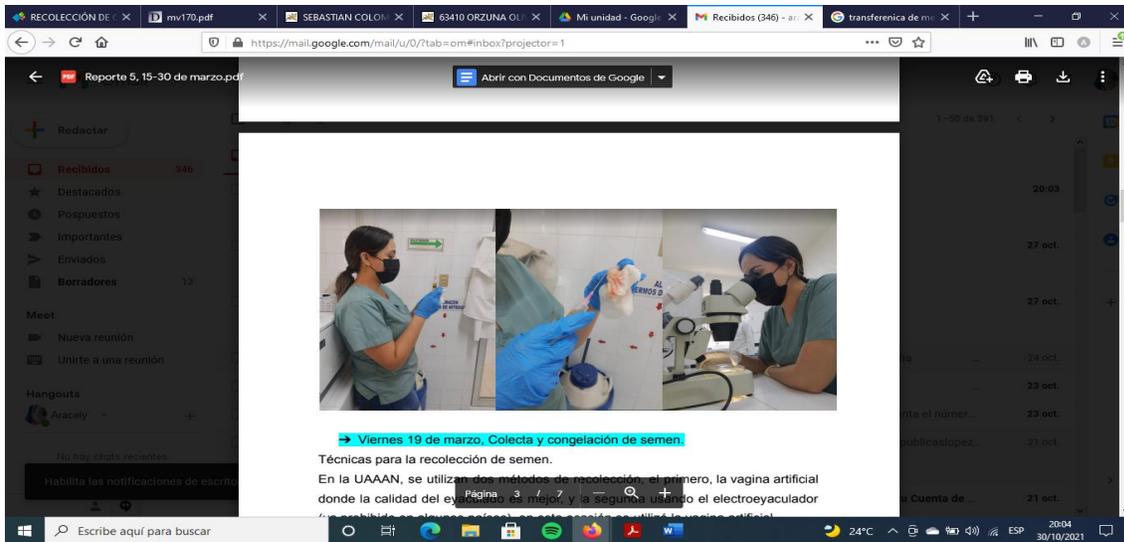


Figura 3: Aspiración folicular en ovarios de rastro.

Los oocitos se obtienen generalmente de folículos antrales mayores a 2mm y menores a 6-7 mm de diámetro ya que los oocitos de folículos mas pequeños carecen de competencia meiótica en cultivo y por esta razón serían incapaces de completar la maduración nuclear. Por otra parte, los oocitos de folículos mas grandes a menudo se encuentran en procesos de atresia, probablemente por esto los mayores porcentajes de fecundación y desarrollo se obtengan con oocitos de folículos entre los 2-7mm (Pavlok *et al.*, 1992).

3.5.2 Aspiración folicular *in vivo* guiada por ecografía (OPU).

La OPU nos permite la recolección de ovocitos de folículos de menos de 1 cm de diámetro. La técnica se realiza introduciendo el transductor por la vagina, manipulado desde el exterior de la vaca, mientras que la otra mano es introducida por el recto para fijar el ovario hacia la cabeza del transductor visualizando el ovario

y los folículos en la imagen ecográfica, una vez fijado el ovario, con movimientos suaves y cuidadosos se atraviesa la pared vaginal con la aguja, puncionando los folículos, cuyo contenido es aspirado por la bomba de vacío y recolectados (Solís-Corrales *et al*, 2012).

Las hembras que se utilizaran deben ser previamente sedadas con xilacina y además recibir anestesia epidural con lidocaína al 2% (3-5 ml/vaca), de modo que se produzca la insensibilización del aparato genital y una disminución de los movimientos peristálticos a nivel del recto, lo cual facilita tanto la localización como la manipulación de los ovarios. Se procede a limpiar y desinfectar la vulva y el perineo (Nava y Hernández, 2005).

Se procede a introducir el transductor que tiene acoplado el sistema de guía de la aguja. La cabeza del transductor debe ubicarse en cualquiera de los lados del cérvix, según el ovario que será puncionado. Con la mano izquierda se fija el ovario contra la cabeza del transductor. El contenido de la punción cae directamente a un filtro o a un tubo de recolección, el cual se mantiene a 37° C hasta el momento de búsqueda y clasificación (Ariza *et al.*, 2006).

La frecuencia de la OPU puede afectar a la calidad y la cantidad de ovocitos recogidos. Esta debe ser efectuada con intervalos de 12-15 días, permitiendo que la donante regrese a su ciclo de forma natural, sin afectar la función ovarica (Arias, 2010).



Figura 4: Aplicación de anestesia epidural.

3.6 Importancia de la calidad ovocitaria para la producción de embriones *in vitro* de embriones.

En el caso de la producción *in vitro* de embriones (PIVE), los ovocitos en la mayoría de los casos provienen de ovarios obtenidos en matadero y aunque estos representan la fuente más abundante de ovocitos, no garantizan la calidad necesaria para obtener de manera constante altas tasas de blastocitos, tampoco se garantiza su valor genético, ni que sean libres de enfermedades, debe tomarse en cuenta la persistencia de los patógenos que se adhieren a la zona pelúcida de los embriones producidos *in vitro* a los lavados a los que son sometidos a fin de garantizar su inocuidad. Entre un 50 y 70% de los ovocitos obtenidos son aptos para la fertilización, alrededor del 90% de estos serán fertilizados y entre el 20 y 40 % alcanzan el estadio de blastocisto. Por esta razón mantener una fuente constante

de ovocitos de alta calidad sanitaria es uno de los puntos clave para garantizar un sistema comercial de producción de embriones (Nava-Trujillo *et al.*, 2004).

La influencia de la calidad del ovocito sobre el desarrollo potencial del embrión, esta reportada en la hembra bovina, más que en cualquiera otra especie (Sirad *et al.*, 2006). Las evidencias indican que la calidad del ovocito es un factor determinante en la producción de embriones y determina cuantos ovocitos se desarrollarán hasta la etapa de blastocisto.

3.7 Evaluación de la calidad ovocitaria.

Debido a que los ovocitos de mamíferos adquieren su potencial de desarrollo de manera gradual durante el desarrollo folicular (Roth, 2015) las alteraciones que generan los cambios de temperatura sobre el mismo se ven directamente reflejadas en la calidad y capacidad de desarrollo del ovocito, determinando con esto la calidad del embrión, ya que el microambiente en el que este crece y se desarrolla tiene gran influencia en su posterior viabilidad. La selección de los ovocitos se basa en tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea (De Castro y Hansen, 2008).

El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar. Según, lo publicado por Estrella *et al.* (2017) varios estudios señalan que para obtener ovocitos de buena calidad se debe aspirar folículos entre los 4-8 mm y los mayores a 8 mm.

Los COC's se clasifican en 5 categorías, según homogeneidad, morfología del citoplasma y compactibilidad de las células del cumulo (Oropeza *et al.*, 2004).

Categoría I: Ovocitos con más de tres capas de células de cumulo compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granulado.

Categoría II: Ovocitos con menos de tres capas de células del cumulo y citoplasma generalmente homogéneo.

Categoría III: Ovocitos con una sola capa de células del cumulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras.

Categoría IV: Ovocitos desnudos.

Categoría V: Ovocitos madurados in vivo, con cumulo expandido.

Los COC's de las categorías I-III se consideran aptos, los ovocitos de categorías IV y V se consideran no viables.

3.8 Producción de embriones *in vitro*.

Los sistemas de maduración *in vitro* deben asegurar que el ovocito resultante complete normalmente su desarrollo y sea capaz de ser fecundado dando origen a un cigoto competente que logre continuar su desarrollo luego de la transferencia. Todo este proceso se reduce a tres pasos: maduración, fertilización y cultivo.

Estos tres pasos son puntos críticos de control, solo del 25 al 40% de todos los ovocitos alcanzan el estadio de blastocito o blastocito expandido, que son estados viables de un embrión (Orellana Banegas y Peralta Peralta , 2007).

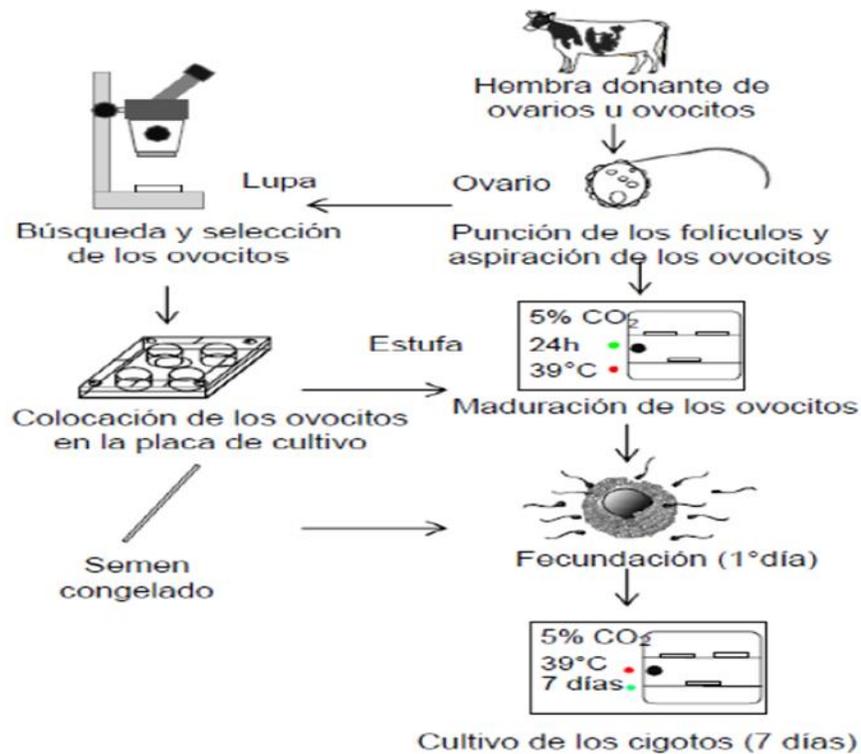


Figura 6. Producción de embriones in vitro (Tomada de Palma, 2008).

La proporción de embriones (producidos mediante maduración y fecundación *in vitro*) que se desarrolla hasta la etapa de blastocito, depende de las condiciones de cultivo y el potencial desarrollo de los ovocitos. Las características definitivas que permiten el complejo cumulo-ovocito adquiriera su completa competencia una vez fecundado y se convierta en un embrión viable, son desconocidas (Bilodeau-Goeseels y Panish, 2002).

3.8.1 Maduración de embriones *in vitro*.

Las condiciones de cultivo durante la maduración *in vitro* juegan un papel crucial en las tasas de fecundación y en la capacidad de desarrollo posterior de los embriones,

hay que recordar que en esta fase del proceso se trata de simular lo que ocurre en las trompas de Falopio después de la ovulación.

Los ovocitos contenidos en los folículos se encuentran en diakinesis, esto quiere decir que se mantienen estáticos, debido a que la corona radiata produce un inhibidor de maduración, este efecto se ve interrumpido por la acción de la hormona luteinizante (LH) en la ovulación, aquí el ovocito pierde contacto con el inhibidor y comienza su proceso de maduración. En el laboratorio de fertilización *in vitro* los ovocitos son puestos a madurar durante 24 h en la cámara de maduración, a una temperatura de 37°C en un medio energético. Durante la maduración hay un crecimiento de los ovocitos a través de 2 divisiones meióticas, la primera división meiótica se inicia con la Metafase I desde el estado de vesícula germinal y avanza hasta la Telofase I donde se da la formación del primer cuerpo polar, mientras ocurre este proceso el ovocito se encuentra bien definido, la zona pelúcida, el espacio perivitelino y el material genético presente en los cromosomas ya están preparados para recibir al espermatozoide y ser fecundados (Moreno, 2004).

De acuerdo con Hafez (1996), la naturaleza de la maduración folicular (inducida o natural), el diámetro del folículo del que se origina el oocito y la cantidad de líquido folicular, no afectan el proceso de maduración de los oocitos.

La duración óptima del tiempo de maduración se ha estandarizado a un periodo de 22-26 hrs, en este lapso se lograría completar la maduración hasta Metafase II (Pavlok *et al.*, 1992).

3.8.2 Fertilización *in vitro*.

La fertilización comprende una serie de procesos, cuyo punto final está representado por la fusión de los núcleos de ambos gametos y la formación del genoma del nuevo individuo. La penetración del espermatozoide desencadena la segunda parte de la división meiótica con la expulsión del segundo cuerpo polar. Simultáneamente se cumple la descondensación de la cabeza espermática y la formación del pronúcleo masculino (Palma, 2008).

Para que la fecundación se lleve a cabo, los espermatozoides deben pasar por el proceso de capacitación, este les permite liberarse de sustancias que les impiden atravesar las células del cumulus y la zona pelúcida. Solo un espermatozoide logra, gracias a la secreción de hialuronidasa. Instantáneamente se da la reacción en la zona y se evita la poliespermia (Moreno, 2004).

3.8.3 Cultivo de embriones *in vitro*.

Este periodo está comprendido entre el día 1 y el día 7 del desarrollo embrionario. El cultivo embrionario se puede definir como el periodo en el cual se desarrollan las estructuras desde presuntos cigotos hasta blastocistos (Smith y Monteiro da Rocha, 2012).

Transcurrido el tiempo de la fertilización, los presuntos cigotos se retiran del medio de la fertilización *in vitro*. Se retiran las células de cumulus cercanas a los presuntos cigotos y luego se clasifican, los cigotos desnudos y de mejor calidad, pasan al sistema de cultivo. La remoción de estas células se puede realizar a través de pipeteo fino, con hialuronidasa, o a través de vortez (agitación) (Gordon, 2003).

El medio de cultivo es un aspecto fundamental en el cultivo embrionario, ya que se debe proporcionar condiciones optimas para el desarrollo del embrión. Según Orellana Banegas y Peralta Peralta (2007) los embriones son mas afectados por factores abióticos que por factores bióticos, los componentes abióticos evaluados en un medio de cultivo son:

Osmolaridad: Es la capacidad que tienen los embriones de absorber agua del medio en que se encuentran para lograr el punto de equilibrio entre las sustancias disueltas en el medio y las presentes en el embrión, esto resulta en una estabilización de la presión ósmotica.

pH: Neutro o logeramente alcalino.

Gases: Los porcentajes deben ser similares a los encontrados en el oviducto de las vacas. Los más usados son 5% O², 90% N², y 5% CO².

Minerales: Los niveles de Na y K deben ser bajos en comparacion de los niveles plasmaticos.

Agua: Es el elemento de mayor proporción en un medio de cultivo. Algunos medios utilizan agua bideztilada, esto para reducir las posibilidades de que resulten problemas con metales pesados.

3.9 Evaluación de la calidad embrionaria.

La competencia de desarrollo de un ovocito, se expresa por su capacidad de soportar los eventos del desarrollo temprano, tales como la extrusión correcta de los gránulos corticales una vez que se produce la fertilización, descondensación de

la cabeza del espermatozoide y división y activación del genoma embrionario (Frei *et al.*, 1998).

Nomenclatura del desarrollo embrionario (Moreno, 2004).

Días de vida:

- 0 Huevo sin fertilizar después de la ovulación.
- 1 Fertilización hasta la primera división celular.
- 2 Embrión de dos células.
- 3 Embrión de cuatro células.
- 4 Embrión de ocho células.
- 5 Embrión de dieciséis células.
- 6 Mórula.
- 7 Blastocisto.
- 8 Blastocisto expandido.
- 9 Blastocisto eclosionado.

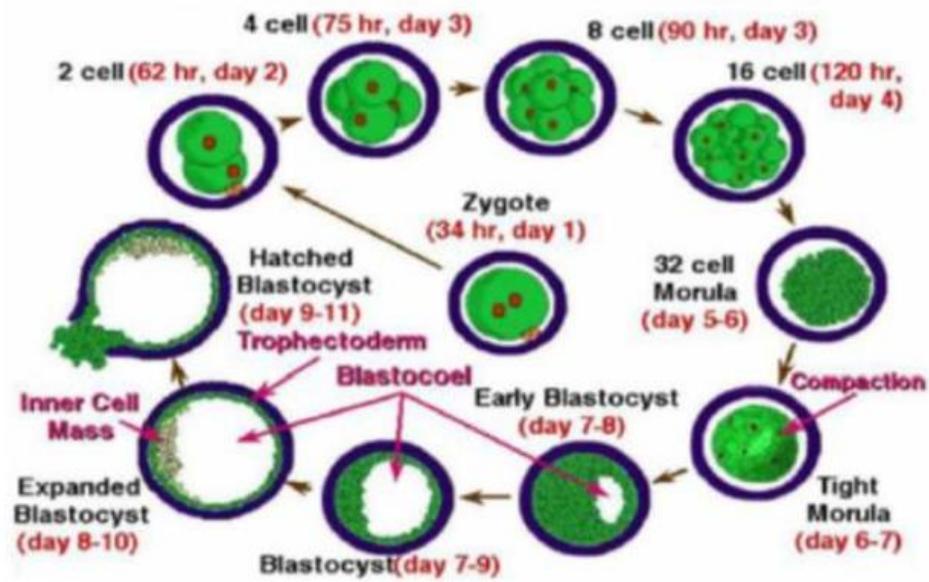


Figura 7. Desarrollo temprano del embrión bovino. (Tomado de Mellisho, 2006).

Grados o códigos de calidad de los embriones (Robertson, 2002).

El rango de la calidad de los embriones es de 1-4:

Grado 1: Excelente o bueno, embriones uniformes en color, tamaño y densidad.

Grado 2: Regular, irregularidades moderadas en los embriones respecto a su tamaño, color y densidad.

Grado 3: Pobre, mayores irregularidades en la masa del embrión, tamaño y color, así como densidad de las células individuales.

Grado 4: Degenerado, embriones de una sola célula, no son viables.

IV Materiales y métodos

El estudio se realizó en un establo comercial ubicado en el Ejido La Torreña en el municipio de Gómez Palacio, Durango, México. Sus coordenadas son longitud (dec): -103.595077 y latitud (dec): 25.611848 msnm. La región tiene un clima cálido extremo, alcanzando hasta los 45°C en verano y descendiendo hasta 0°C en invierno, con una precipitación anual de 235 mm y humedad relativa de 25 a 65%.

Este estudio fue desarrollado con ganado de raza Holstein Friesian, el cual se encuentra en un sistema estabulado, son alimentadas de acuerdo con sus requerimientos y en concordancia del NRC 201, el manejo general de las vacas es siguiendo el protocolo establecido por el establo y el manual de buenas prácticas de manejo (SAGARPA, 2010).

4.1 Selección de donadoras

Las donadoras fueron seleccionadas evaluando primeramente el historial productivo (> 10,000 kg / lactancia), que tuvieran un récord de estado de salud bueno, con paridad similar (4-6 lactancias) un buen historial reproductivo (previo a la aspiración se realiza una revisión ginecológica para descartar presencia de patologías) y que contaran con una condición corporal de 3-3.5, en una escala del 1 al 5.

La técnica de OPU consistió en la recolección de ovocitos (con ayuda de una aguja introducida por la vagina) mediante la punción de los folículos visualizados a través de un ecógrafo y fue realizada de acuerdo con lo descrito por Solís (2012).

Una vez obtenidos los complejos cumulo-ovocito (CCO's) fueron seleccionados y clasificados en base al número de capas de células del cúmulo y la homogeneidad del citoplasma del ovocito siguiendo lo recomendado por De Loos (1989).

Después de evaluar a los ovocitos fueron transportados al laboratorio en medio de maduración en un ambiente controlado con 38.5°C y 5% de CO₂ saturado de humedad. A las 23h se realizó la fertilización *in vitro* (FIV) con semen sexado para hembra. Previo a este proceso se realizó la capacitación espermática por medio de la técnica de percoll para obtener solo a los espermatozoides capaces de fertilizar a los ovocitos. Ya en el medio de fertilización los ovocitos se mantuvieron en un ambiente controlado con 38.5°C y 5% CO₂ saturado de humedad. A las 18h post FIV, los presuntos embriones fueron despojados de sus células cumulares por medio de la técnica de pipeteo y colocados en medio de cultivo e incubados a un ambiente óptimo para su maduración. El día 7 post FIV se clasificaron y seleccionaron aquellos embriones con calidad grado I, estos fueron transferidos en fresco o congelados por la técnica de congelación lenta de acuerdo a Bó y Mapletoft (2013).

La producción de embriones *in vitro* estuvo a cargo de la empresa ABS- Laboratorio de producción de embriones, se obtuvieron los complejos cúmulo-ovocito (CCO's) mediante la aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía.

4.2 Diseño del experimento.

Cuadro 1. Aspiración de ovocitos y producción de embriones *in vitro*.

Aspiración de ovocitos y producción de embriones <i>in vitro</i>		
	Calor	Frio
Número de vacas donadoras de ovocitos	49	45
Número de ovocitos recolectados para cultivo	490	589

4.3 Variables analizadas.

Para cumplir con el objetivo de este estudio, se evaluó la competencia de los ovocitos aspirados y seleccionados para cultivo, considerando como éxito en la primera variable el clivaje de un embrión y en la segunda la obtención de un embrión transferible clasificándolo según Bó y Mapletoft (2013).

4.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con PROC CATMOD de SAS® Studio, ajustando un modelo logístico para una variable binomial. Considerando como éxito en la primera variable el clivaje y para la segunda el embrión con capacidad de ser transferido.

V Resultados

Se pudo observar una diferencia significativa entre las dos temporadas de aspiración de ovocitos (Cuadro 1), teniendo una respuesta favorable en la temporada de frío tanto para llegar a la etapa de clivaje (38% en calor; 60% en frío, $P < 0.001$), y para llegar a la etapa de un blastocito con potencial para ser transferido o congelado (8% en calor; 15% en frío, $P < 0.001$). Teniendo como respuesta que los ovocitos aspirados en temporada de frío obtuvieron una mejor respuesta tanto en clivaje como en embriones producidos, en comparación con los aspirados en temporada de calor.

Cuadro 2. Colección de ovocitos y producción embrionaria *in vitro* en vacas Holstein en temporada de calor y frío.

Temporada	Número de ovocitos seleccionados	Número de embriones clivados (% ov/CLIV)	Embriones totales transferibles (% ov/EB)
Calor	490	189 (38) ^a	39 (8) ^a
Frio	589	355 (60) ^b	88 (15) ^b

ov: ovocitos seleccionados. CLIV: embriones clivados. EB: embriones totales transferibles

^{ab}Literales diferentes entre filas indican diferencia ($P < 0.001$).

VI Discusión

Este estudio demostró claramente que existe un efecto por la temporada de obtención de ovocitos por medio de la técnica de OPU para la producción de embriones *in vitro* en vacas Holstein Friesian. Siendo así la temporada de calor la más afectada (clivaje, 38%; embriones, 8%).

Se ha documentado que el estrés calórico tiene un efecto perjudicial en la reserva de ovocitos de las vacas bajo esta condición. Al respecto Gendelman *et al.*, (2010), realizaron estudios donde encontraron menor competencia ovocitaria en las primeras divisiones embrionarias, cuando los ovocitos se obtuvieron de vacas en condiciones de estrés calórico (verano). En otro estudio realizado por Edwards *et al.* (2009), observaron que la maduración en los ovocitos cultivados *in vitro* expuestos a un estrés por calor (41°C) durante 12 h fue afectada y resultó en una baja producción de embriones, al igual que lo reportado por Jyh-Cherng *et al.* (1999) quienes observaron que la capacidad de desarrollo de los ovocitos se reducía significativamente al estar expuestos a 43 °C en cultivo *in vitro*.

Los resultados del presente estudio podrían explicarse con lo observado por Wolfenson *et al.* (1995), donde observaron que la dinámica folicular se vio afectada en vacas expuestas a la luz solar directa durante 7 horas y posteriormente trasladadas a sombra sin un sistema de refrigeración, teniendo un nivel de hipertermia (40.5 °C) y en las vacas control (39.0 °C). Otras posibles causas del daño en el ovocito por el estrés calórico, pueden darse por los cambios morfológicos en las células de este, provocando un estrés oxidativo, fragmentación nuclear y

deterioro mitocondrial (Roth, 2018), al respecto, (Nabeneshi *et al.* (2012) mencionan que se puede inducir la apoptosis por el exceso de las especies reactivas de oxígeno y por el agotamiento del glutatión, enzima que participa en el organismo como antioxidante.

El éxito en el desarrollo de un embrión mayormente depende de la calidad del ovocito y en cuanto a los resultados de la producción embrionaria se pudo observar en esta investigación que la temporada cálida fue la de menor producción ya que el embrión en sus primeras etapas de desarrollo y antes de la implantación es muy sensibles al estrés calórico.

En este orden de ideas, se ha encontrado que los embriones de dos células son más sensibles al estrés calórico que aquellos en etapas avanzadas Hansen (2007). Esto probablemente se deba a la activación del genoma embrionario durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, este mismo autor observó que cuando expuso a los ovocitos inmaduros en cultivo de maduración durante 6 h a una temperatura de 41 °C durante 12 h, resultó en una disminución en la proporción de embriones que llegaron a la etapa de 8 a 16 células, y redujo significativamente el desarrollo del embrión para poder llegar a la etapa de blastocito, evidenciando el daño ocasionado por las altas temperaturas en el desarrollo embrionario

En este estudio se pudo observar que la mejores condiciones ambientales o temporada para la recolección de ovocitos es durante la temporada de frio, esto se debe posiblemente a que durante esta temporada el ovocito recolectado no ha sufrido el estrés por calor, por lo que su material genético no ha sido dañado en comparación con los ovocitos aspirados en temporada de calor. Los ovocitos

obtenidos en condiciones de frío o temperaturas más bajas, fueron de mayor calidad y tienen mayor posibilidad de llegar a la etapa de blastocisto.

VII Conclusiones

Se concluye que las condiciones ambientales de calor afecta negativamente la calidad ovocitaria y la producción de embriones *in vitro*, mientras que en condiciones ambientales de frío se obtuvieron los mejores porcentajes de producción embrionaria.

VIII Recomendaciones

De acuerdo a estos resultados se podría pensar que es necesario investigar si esta respuesta negativa al estrés por calor puede mitigarse utilizando alguna herramienta biotecnológica como es el uso de la transferencia de embriones congelados, considerando producir los embriones en condiciones o temporada de frío.

IX Literatura citada

- Aréchiga , F., Vázquez , F. S., Ortiz, O., Hernández, C. J., Porras, A., McDowell, L., & Hansen, P. (1998). Effect of injection of B-carotene or vitamin E and selenium of fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 50: 65-76.
- Arechiga, C. F., & Hansen, P. (2003). Efectos climáticos adversos en la función reproductiva de los bovinos. 25-33.
- Arias, M. (2010). Comparación técnica y económica de dos técnicas de mejoramiento genético: Transferencia de embriones (TE) y Fertilización in vitro (FIV) en la hacienda El Trébol, Santa Cruz, Bolivia. . *Proyecto especial de graduación del programa de ingeniería agronómica, escuela agrícola panamericana, Zamorano. Honduras.*, 13.
- Ariza, L., Camacho, W., & Serrano-Novoa, C. (2006). Evaluación retrospectiva de la tasa de preñez obtenida por transferencia de embriones en diferentes bovinos en el municipio de Puerto Araujo, Santander, Colombia. *REDVET 1695-7504*, Vol. VII, nº04.
- Bilodeau-Goeseels, S., & Panish, P. (2002). Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci.*, (71):143-155.
- Bó, G., & Mapletoft, R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, .10, 344-348.
- Britos Cano, A., Javier Acosta, T., Román Álvarez, R. D., Giménez Ferreira, F. D., & Domínguez, R. A. (2020). Manual de transferencia de embriones. *PROCIENCIA-CONACYT*, 31.
- Buestan Carabajo, P. D. (2011). Fisiología del estrés y sus efectos sobre la reproducción de la hembra bovina. *Universidad de la Cuenca, FCA, Escuela de medicina veterinaria y zootecnia* , 48-49.
- Cleeff J, V., MC, L., Wilcox, C., & Thatcher, W. (1992). Plasma and milk progesterone and plasma LH in ovariectomized lactating cows with new or used controlled internal drug release devices. *Anim Reprod Sci*, (27) 91-106.
- Columbiano, V. (2007). Identificacao de QLT nos cromossomos 10, 11 e 12 associados ao estresse calorico em bovinos. *Dissertacao inestrato, departamento de zootecnia, Universidade Federal de Vieosa, minas Gerais*.
- De Castro e, P., & Hansen , P. (2008). Modification of actions of heat shock on development and apoptosis of cultured preimplantation bovine embryos by oxygen concentration and dithiothreitol. *Mol reprod dev*, 1338-1350.

- De Loos, F., Vielt, C., Maurik, & Th.A.M. Kruij. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete research* 24, 197-204.
- Díaz Pazmiño, C. A., & Hurtado Bernal, F. A. (2010). Evaluación de la viabilidad y el desarrollo de embriones bovinos obtenidos por fertilización in vitro incubados en oviductos ovinos. *Trabajo de grado para la Facultad de ciencias agropecuarias, Universidad de La Salle*, 9.
- Díaz Pazmiño, C. A., & Hurtado Bernal, F. A. (2010). Evaluación de la viabilidad y el desarrollo de embriones bovinos obtenidos por fertilización in vitro incubados en oviductos ovinos. *Universidad de La Salle-Ciencia Unisalle*, 77.
- Ding , L., Tian , H., Wang , J., Chen , J., Sha , H., Chen, J., & Cheng , G. (2008). Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Mol. Repord Dev*, 1710-1715.
- Estrella, C., Suconota, A., & Ayala, L. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *MASKANA, Producción Animal*,3.
- Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción In vitro de embriones bovinos. *Revista de la facultad de ciencias veterinarias* , v.48 n.1.
- Frei, R., Schultz, G., & Church, R. (1998). Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16 cell stage of embryogenesis in the cow. *J. Reprod Fertil*, (86): 637-641.
- Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R., & Lazzari, G. (2001). Embyop production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 1341-1357.
- Gendelman, M., Aroyo, A., Yavin, S., & Roth , Z. (2010). Seasonal effects on gene expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, 72-83.
- González , O. (2000). Fisiopatología veterinaria . *La Habana Cuba: Feliz Varela*.
- Gordon, I. (2003). Laboratory production of cattle embryos, 2nd ed. *CABI Publishing*, 592.
- Hafez, E. (1996). Reproducción e Inseminación artificial en animales. *Interamericana McGRAW-HILL 6a. ed*, 542.
- Hasler , J. (1992). Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 75: 2857-2879.
- Jyh-Cherng, J., Parks, J., & Yang, X. (1999). Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Mol. Reprod.*, 53(3):336-340.

- Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N., & Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest Prod Sci*, 77, 59-91.
- Kruip, T., Boni, R., Wurth, Y., Roelofsen, M., & Pieterse, M. (1994). Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, 675-684.
- Macmillan, K., Taufa, V., & Day, A. (1993). Combination treatments for synchronising oestrus in dairy heifer. *Proc NZ Soc Anim Prod*, (53): 267-270.
- Maquez, M. A., Medina, L. F., & Dick, A. (2015). Efecto del estrés calórico sobre la fertilidad en vacas lecheras. *Facultad de Ciencias Veterinarias-UNCPBA*, 20.
- Mellisho. (2006).
- Moreno, J. (2004). Transferencia de embriones en bovinos. *Texas, EUA*, 97 p.
- Nabeneshi, H., Ohta, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K., & Tsuzuki, Y. (2012). The effects of cysteine addition during in vitro maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*, 20(3): 249-59.
- Nava, T. H., & Hernández, F. H. (2005). Aspiración folicular transvaginal. *Maracaibo, Venezuela*, 611-614.
- Nava-Trujillo, H., MV, Hernández-Fonseca, H., MV, & PhD. (2004). Aspiración folicular transvaginal. *Programa de reproducción bovina. División de estudios para graduados, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*, 640-646.
- Orellana Banegas, M., & Peralta Peralta, E. (2007). Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and sexing technologies. *GRI*, 35.
- Oropeza, A., Wrenzycki, C., Hermann, D., Hadel, K., & Niemann, H. (2004). Improvement of the Developmental Capacity of Oocytes from Prepubertal Cattle by Intraovarian Insulin-Like Growth Factor-I Application. *Biol. Reprod*, 70:1634-43.
- Oropeza, A., Wrenzycki, C., Hermann, D., Hadel, k., & Niemann, H. (s.f.). Improvement of the Developmental Capacity of Oocytes from Prepubertal Cattle by Intraovarian Insulin-Like Growth Factor-I a.
- Palma, G. (2008). Biotecnología de la Reproducción (2da ed.). *Buenos Aires, Argentina: Rebiotec*, 237-240.
- Palma, G. (s.f.). Biotecnología de la reproducción (2sa edición).

- Pavlok, A., Lucas-Hanhn, A., & Nienian, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol.Reprod* , 31, 61-67.
- Pulido, E. (2011). Efecto del enfriamiento por aspersión y ventilación en la producción de leche en ganado Holstein. *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Michoacan, Mexico.*
- Ramírez Orozco, J. A. (2020). Formación en producción in vitro de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia. *Trabajo de grado. Programa de biología, Universidad CES, Medellín.*, 3.
- Robertson, E. (2002). Non-Surgical Embryo Transfer. 8th Edition. *Harrogate Genetics International, Inc. Tennessee, USA*, 33.
- Roth, Z. (2015). Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *Physiology and endocrinology symposium.*, 93(5): 2034-44.
- Salgado Cruz, E., & Lopera-Vásquez. (2020). Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Rev. investig. vet. Perú*, vol.31 no.3.
- Sheen, S., & Riesco, A. (2002). Factores que afectan la producción de leche en vacas de doble propósito en el trópico húmedo (Pucallapa). *Revista de investigación de Perú*, 13 (1): 25-31.
- Sirad , M., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* (65), 126-136.
- Smith, G., & Monteiro da Rocha, A. (2012). Advances in embryo culture systems. *Semin rerprod Med.*
- Solís Corrales , A., Guerra , R., Sandoya, G., & De Armas, R. (2012). Efecto de sincronización de la onda folicular y de la frecuencia de aspiración de folículos en novillas de la raza Brahman. *REDVET*, Vol 13 N°10.
- SUSS. (1987). Characterisation of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *Symposium on biotechnology in animal breeding. Japanese-German Centre, Berlin.*
- Tribulo, H. (2021). Capítulo 22. Transferencia de embriones y producción de embriones in vivo. *Reproducción de animales domésticos.*, 22.3.1.
- Wetscher, F. (2005). Effect of morphological properties of transferred embryonic stages on tubal migration: Implications for in vivo culture in the bovine oviduct. *Theriogenology*, 41-48.

Wolfenson, D., Thatcher, W., Bandinga, L., Savio, J., Meidan, R., Lew, B., . . . Berman, A. (1995). Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biology of reproduction*, 52, 1106-1113.