

ESTADO ACTUAL, PROYECCIONES Y PERSPECTIVAS DE LA FERTILIZACIÓN *in vitro*
(FIV) EN LA GANADERÍA BOVINA EN COLOMBIA

DIEGO ALEJANDRO MORENO ESPEJO

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE -
ECAPMA
ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA
TUNJA
2018

ESTADO ACTUAL, PROYECCIONES Y PERSPECTIVAS DE LA FERTILIZACIÓN *in vitro*
(FIV) EN LA GANADERÍA BOVINA EN COLOMBIA

DIEGO ALEJANDRO MORENO ESPEJO

Código: 7185354

Monografía presentada como requisito para optar al título de:

ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA

Asesor:

Dr. EDWIN MANUEL PÁEZ BARÓN

M.V.Z., Esp, Mg, Dr.

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE -

ECAPMA

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA

TUNJA

2018

RESUMEN

La biotecnología reproductiva ha sido una herramienta fundamental en la producción de embriones de la especie bovina en Colombia, con lo cual se ha logrado un avance significativo en cuanto a nivel de productividad, calidad y eficiencia reproductiva. Aunque, tradicionalmente ha sido de difícil acceso a los pequeños productores pecuarios por los altos costos. La aplicación de la técnica de fertilización *in vitro* (FIV) ha abierto las puertas a la posibilidad de obtener embriones bovinos tanto para la investigación científica como para el sector comercial.

Actualmente, los ovocitos son obtenidos a través de ovarios recolectados en plantas de beneficio o de bovinos de alta calidad genética por medio de aspiración folicular con ultrasonido, donde los ovocitos obtenidos son posteriormente colocados en medios de maduración, fecundados con semen de alto valor genético y cultivados en condiciones especiales durante unos días. Por último, los embriones son aptos para ser transferidos en fresco a una hembra receptora o para su posterior criopreservación. Dicha técnica ofrece grandes beneficios a futuro para los productores pecuarios colombianos, pues se logra obtener una mejora en la eficiencia productiva. Además, se logra un aumento en la velocidad de mejoramiento genético de los sistemas de producción ganaderas colombianas. Por lo cual, se hace necesario mejorar la eficiencia de la técnica para aumentar el número de embriones producidos y obtener rendimientos que sean rentables para los ganaderos.

Palabras clave: Fertilización *in vitro*, biotecnología reproductiva, embriones, productividad, calidad, eficiencia reproductiva, protocolos.

ABSTRACT

Reproductive biotechnology has been a fundamental tool in the production of bovine embryos in Colombia, which has achieved significant progress in terms of productivity, quality and reproductive efficiency, which has traditionally been denied to small producers. The high costs of accessing it. The maturation of oocytes and the application of *in vitro* fertilization techniques (IVF) has opened the door to the possibility of obtaining bovine embryos for scientific research and for the commercial sector that increasingly fancy this type of embryos produced by the Application of reproductive biotechnologies. Actually oocytes are obtained through ovaries harvested from profit plants or cattle of high genetic quality by means of follicular aspiration with ultrasound, where the oocytes obtained are later placed in maturation media, fertilized with semen of high genetic value, and grown in special conditions for a few days. Finally the embryos are apt to be transferred n fresh to a receiving female or for their subsequent cryopreservation. The *in vitro* fertilization (IVF) technique offers great benefits for Colombian livestock producers in the future, since it improves production efficiency and in addition, it improves the breeding speed of Colombian livestock farms, where It is necessary to improve the protocols to increase the number of embryos produced and to obtain yields that are profitable for the breeders.

Key words: *In vitro* fertilization, reproductive biotechnology, embryos, productivity, quality, reproductive efficiency, protocols.

INDICE GENERAL

	Pág.
i RESUMEN	
ii ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	9
2. EVOLUCION DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA	11
3. DESCRIPCION DE LA TECNICA DE FERTILIZACION <i>in vitro</i>	17
3.1 Metodologías para la obtención de ovocitos bovinos	17
3.1.1 <i>Recolección y transporte de ovarios (Plantas de beneficio)</i>	17
3.1.2 <i>Técnica de aspiración folicular (Ovum Pick-Up; OPU)</i>	18
3.2 Producción <i>in vitro</i>	21
3.2.1 <i>Maduración de ovocitos bovinos</i>	22
3.2.2 <i>Capacitación de semen in vitro</i>	24
3.2.3 <i>Proceso de fertilización in vitro (FIV)</i>	27
3.2.4 <i>Maduración in vitro de los embriones bovinos</i>	31
3.2.5 <i>Desarrollo embrionario en FIV</i>	35
3.3 Componentes de los medios de cultivo	37
3.3.1 <i>Parámetros biofísicos y elementos inorgánicos</i>	37
3.3.2 <i>Compuestos orgánicos</i>	39
4. FERTILIZACIÓN <i>in vitro</i> EN COLOMBIA	42
4.1 Estado de la técnica	47
5. PROYECCIONES Y PERSPECTIVAS	49

6. VENTAJAS Y DESVENTAJAS	54
7. CONCLUSIONES	58
8. REFERENCIAS	60

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Clasificación de los embriones según normas IETS.	36

INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Tiempo requerido para la capacitación y duración de la motilidad espermática, y duración de la fertilidad de los gametos en diferentes especies.	25
TABLA 2. Medio de IVF-SOF (50ml).	28
TABLA 3. Medio de fecundación (FIV)	28
TABLA 4. Formulación final del medio de fecundación.	28
TABLA 5. Dilución de heparina para la fecundación.	28
TABLA 6. Medio de cultivo CR1 Stock para cultivo de embriones.	34
TABLA 7. Formulación final del medio de cultivo CR1 suplementado con 3mg/ml de BSA y aminoácidos (aa).	34
TABLA 8. Clasificación de los embriones según normas IETS.	36

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología reproductiva ha tenido un marcado avance en los últimos años, donde se han evidenciado las posibles aplicaciones, tanto en el área de la medicina como en la actividad de producción agropecuaria emergentes de la misma, y ha proporcionado las herramientas necesarias para manipular y alterar el genoma de las especies de interés zootécnico, donde el desarrollo de nuevas y más eficientes tecnologías para la reproducción *in vitro*, especialmente de líneas de bovinos genéticamente superiores se hace esencial para optimizar los recursos, mejorar la productividad y reducir el impacto sobre el medio ambiente. El desarrollo de nuevos procesos para la multiplicación *in vitro* de líneas de animales genéticamente superiores, se basa en el avance de las técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y en el cultivo de embriones (Fernández *et al.*, 2007).

La FIV es el proceso mediante el cual el espermatozoide penetra y fecunda al óvulo para determinar la creación de un nuevo individuo en unas condiciones controladas de laboratorio. En este modo se ofrecen las condiciones necesarias para llevar a cabo dicho proceso mediante el control de los diversos pasos involucrados, como lo son la maduración e interacción de dichos gametos masculinos y femeninos en un ambiente controlado (García, 2013).

Es de suma importancia anotar que el proceso de desarrollo de embriones bovinos producidos mediante la FIV ha presentado dificultades en el momento de la implantación de dichos embriones, sin llegar a evidenciar si este inconveniente es debido a malas prácticas en

alguna de las etapas involucradas en la maduración y fertilización de los gametos o a la reducción de competencias de los ovocitos manipulados *in vitro* (Martínez, O. 2016).

Igualmente, mediante dicho método se puede realizar una valoración de la capacidad fertilizante de óvulos y espermatozoides, realizar una diversificación del material genético valioso y escaso (Even, 2006), además de prolongar la vida productiva de bovinos valiosos genéticamente al reducir la carga fisiológica que implica el proceso de gestación bovino normal (Leivas, 2011). Adicionalmente, tener la capacidad de crear bancos genéticos de animales con un alto estándar de productividad, determinar el género de los embriones producidos y cuidar material genético de bovinos de razas en peligro de extinción (FAO, 2010).

No obstante, habiendo mencionado lo anterior, es necesario señalar que la FIV ha tenido grandes dificultades para su aplicabilidad en Colombia, dado que uno de los mayores obstáculos es lograr que los costos estén por debajo de los ingresos. La FIV establece bajos costos siempre y cuando el número de óvulos a fecundar sea alto, así como su valor genético (Hernández, 2001).

De allí surge la necesidad de revisar el estado de la FIV y realizar un minucioso análisis de las proyecciones y perspectivas de su utilización en la ganadería bovina colombiana, para lograr ofrecer mejoras considerables al productor bovino en cuanto al dominio de la fertilización *in vitro*, de manera que se logre evidenciar si la técnica es y será en un futuro una herramienta confiable, sostenible y sustentable, con la cual se logre aumentar la producción, selección y comercialización de embriones bovinos que contribuya al progreso de la transferencia de embriones bovinos en Colombia.

2. EVOLUCION DE LA BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA

La evolución de la biotecnología reproductiva ha tenido diferentes actores con el transcurso del tiempo y las necesidades, es así como en 1780 Spallanzani obtuvo cachorros caninos a partir de la práctica de inseminación artificial de una hembra adulta, constituyéndose en uno de los primeros reportes de la utilización de herramientas para los procesos de control y manipulación de la reproducción en especies de interés zootécnico.

Ya para el año 1900, el científico ruso Ivanov da un gran salto en la aplicabilidad de la tecnología al servicio de la reproducción al crear la vagina artificial para la recolección de material seminal de los machos con lo cual logró expandir su uso a otras especies (Adamiak *et al.*, 2005). En la década de 1940 se realizaron grandes avances en las técnicas de conservación, congelación y almacenamiento del semen, investigación que fue liderada por los científicos de la Universidad de Cambridge en Inglaterra.

Hacia 1950 Gregory Pincus informa por primera vez la realización de investigaciones en el campo de la maduración *in vitro* (MIV) en mamíferos. También en ésta década, hacia 1951, Austin y Chang investigan sobre los mecanismos implicados en la fertilización y se da la identificación del proceso y el mecanismo de la capacitación espermática, lo cual se convirtió en uno de los principales descubrimientos que contribuyó al desarrollo de la técnica de FIV, donde los investigadores postularon que los espermatozoides de algunas especies de mamíferos necesitaban residir por algún tiempo dentro del tracto reproductivo femenino antes de adquirir la capacidad de penetrar los ovocitos; precisamente Austin, fue quien acuñó el término 'capacitación' para referirse al cambio que los espermatozoides sufren al someterse

al ambiente del tracto reproductivo de la hembra para adquirir la capacidad de penetrar el ovocito y desencadenar el proceso de fertilización (Bavister, 2002).

Antes de este descubrimiento se venían desarrollando muchos experimentos e investigaciones relacionadas con la FIV, pero la mayoría tuvo fracasos en sus resultados, explicados por el desconocimiento de la necesidad de la capacitación del espermatozoide para la adquisición de la capacidad fecundante.

Gracias al hallazgo del proceso de capacitación espermática, se logró en la década del 50 el nacimiento de crías de conejo, producto de la fertilización *in vitro* (Chang, 1968). Posteriormente Whittingham (1968), Iwamatsu y Chang (1969, 1970) y Toyoda *et al.* (1971) citados por Bavister (2002) reportaron la fertilización *in vitro* de ovocitos de ratón usando espermatozoides capacitados *in vitro*.

Thibault y Dautier (1961) reportaron la fertilización *in vitro* de ovocitos de oveja y de cerdo; sin embargo, pasaron muchos años desde este primer reporte en estas especies antes de poder desarrollar protocolos compatibles con resultados óptimos en cuanto a estructuras embrionarias viables para éstas especies. En la especie felina, se reportó por Bowen (1977) la primera FIV usando espermatozoides capacitados *in vitro*. En los caninos el primer reporte de fertilización *in vitro*, data del año de 1976 por Mahi y Yanagimachi.

Sreenan (1970) reporta la observación del proceso de maduración nuclear de ovocitos bovinos, que fueron obtenidos de donadoras en sacrificio. En 1970, ocurre por primera vez el

proceso completo de fertilización *in vitro* (FIV) descrito por los japoneses Iritani y Niwa. Brackett (1982) informa el nacimiento del primer ternero vivo producido por medio de FIV. También Lambert (1983), logra el nacimiento de seis terneros por FIV y en Japón el primer becerro fue obtenido por Hanada en 1986 (Gordon, I. 1994).

La medicina veterinaria y la zootecnia han logrado avances importantes en cuanto a biotecnología reproductiva se refiere, teniendo grandes beneficios en el campo de la FIV y la transferencia de embriones, lo que ha impulsado la industria pecuaria, que tradicionalmente ha tenido la necesidad de producir más, a un menor costo y con una calidad alta, y dándose como una respuesta directa a la baja productividad en el sector agropecuario.

En Colombia, se ha visto un gran aumento en la implementación de las diversas biotecnologías reproductivas como lo son: la superovulación, la transferencia de embriones y la fertilización *in vitro*. Ésta última técnica se ha visto impulsada por en el incremento del potencial reproductivo de las diversas razas bovinas de interés zootécnico. Tradicionalmente en Colombia, el acceso a este tipo de biotecnologías va en función a la capacidad adquisitiva de quien necesite el servicio y la calidad genotípica y fenotípica de los animales a tratar; lo cual, se ve reflejado en la dificultad de acceso a biotecnologías reproductivas de punta para los productores de bajos recursos económicos y con animales de baja calidad genética, cuando el fin es productivo.

No obstante, también se viene trabajando con gran intensidad a nivel investigativo y académico, para lo cual se tiene por ejemplo, la obtención de ovocitos de ovarios de las

hembras bovinas sacrificadas en plantas de beneficio, las cuales se convierten en una excelente alternativa para la producción de embriones que pueden ser destinados a la investigación y a la práctica de otras biotecnologías reproductivas. Así mismo, viene en crecimiento la cantidad de profesionales y centros dedicados a la producción comercial de embriones *in vitro*, constituyendo una buena alternativa al fomento de la utilización de esta técnica en la producción ganadera del país.

Si bien se ha observado un incremento en la implementación de la FIV en Colombia durante los últimos años, aún existe una baja tasa de producción de embriones *in vitro* frente a otros países de la región como lo son Argentina y Brasil, y más aún frente a países desarrollados; por lo anterior, se hace necesario seguir fortaleciendo la labor investigativa en referencia a los procesos de maduración, fertilización y desarrollo *in vitro*, con el fin de poder optimizar el acceso a estas herramientas reproductivas a nivel de los productores bovinos.

Por otro lado, es importante analizar la explosión demográfica que vive la humanidad en la actualidad, y que según lo reporta la ONU en su informe llamado "Estado de la Población Mundial 2018" elaborado por el Fondo de Población de las Naciones Unidas, la población mundial llegó a 7.600 millones de personas para el año 2018, y se espera siga creciendo exponencialmente. Colombia no es la excepción a la regla, pues para éste año reportó una población de 50'002,971 habitantes según el DANE.

Este constante crecimiento demográfico mundial y nacional genera grandes preocupaciones en cuanto a la capacidad productiva y reproductiva de las diferentes especies de interés zootécnico para producir alimentos de alta calidad nutricional y en cantidades suficientes para suplir las necesidades alimenticias de una población creciente y con demanda de proteína de origen animal, en donde la especie bovina es una de las de mayor consumo, acorde a los patrones de consumo de la región con alta demanda por los productos de origen bovino.

Por lo anteriormente expuesto, la comunidad científica de la mano de los productores bovinos se ha interesado en el uso de las diferentes biotecnologías enfocadas en la reproducción asistida bovina con el fin de incrementar la producción animal (Hu, 2010). De esta forma se logra aprovechar el potencial genético de los animales con los que se cuenta en el país y poder tener un avance a nivel de mejoramiento genético mucho más veloz que los que puedan llegar a obtener de forma convencional (Smith y Niemann, 1999; Baldassarre, 2005; Robledo *et al.*, 2009; Ruíz *et al.*, 2010; Vázquez, 2010).

La implementación y masificación de las diferentes biotecnologías reproductivas bovinas en Colombia, ha tenido algunas limitantes relacionadas con las grandes expectativas que se generan, las cuales no coinciden con los pobres rendimientos obtenidos en algunos casos, en cuanto al bajo número de embriones transferibles a hembras receptoras y los altos costos que implica este tipo de procesos y procedimientos.

En este sentido, existe gran variabilidad en cuanto a la respuesta de tratamientos, explicado en parte por la diferencia en el estado corporal de las hembras donantes de ovocitos y hembras receptoras de embriones; así como, los machos donantes del semen, los cuales deben estar en un estado reproductivo óptimo, lo cual genera circunstancias de incertidumbre para el productor.

Debido a lo anterior, surge la necesidad de implementar otros métodos y alternativas para la producción de embriones como la fertilización *in vitro*, la cual constituye una de las más grandes y eficientes herramientas para la mejora genética del bovino y representa un gran logro para los ganaderos e investigadores que buscan mejorar la productividad de los sistemas productivos bovinos, lo cual redundará en una mejora del potencial productivo bovino de nuestro país, generando numerosas ventajas en cuanto a selección genética se refiere.

3. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE FERTILIZACIÓN *in vitro*

3.1 Metodologías para la obtención de ovocitos bovinos

3.1.1 Recolección y transporte de ovarios (*Plantas de beneficio*)

En este método, se realiza la recolección de ovarios a partir de hembras sacrificadas en plantas de beneficio para ser sometidos al proceso de aspiración folicular (Pontes, 2011), donde los folículos deben tener un tamaño promedio de entre 3 y 6 mm (Herradón *et al.*, 2007). Mediante este método se puede aprovechar el material genético en hembras sacrificadas por descarte, fusil sanitario u otros motivos como muertes accidentales o enfermedades que comprometan la vida de bovinos de alta calidad genética (Diez *et al.*, 2010).

El uso de ésta metodología proporciona grandes cantidades de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo embrionario a un bajo costo, donde en promedio se pueden llegar a obtener 10 ovocitos por ovario aspirado para su posterior maduración y fertilización *in vitro* y alcanzar avanzados estados de desarrollo embrionario (Hincapié, 2010).

Posteriormente, el transporte del material genético obtenido es llevado al laboratorio en un recipiente que contiene una mezcla de solución salina + antibiótico a temperatura ambiente (hasta 22 °C hasta por 5 horas) (Block, 2011). Ya en el

laboratorio se enjuagan dos veces con etanol al 70% + solución salina, y posteriormente, en ésta misma solución se mantienen a una temperatura de entre 35 – 37°C en un recipiente plástico para realizar la aspiración de los ovocitos (Garde *et al.*, 2017).

3.1.2 Técnica de aspiración folicular (Ovum Pick-Up; OPU)

Esta técnica se realiza mediante el proceso de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido (OPU, Ovum Pick-Up, su denominación en inglés) (Rodríguez, 2012). Ésta técnica ha sido bastante usada en nuestro medio para lograr la recuperación de ovocitos bovinos *in vivo* (FEDEGAN, 2015; Pontes, 2011), para su consecuente maduración, fertilización y cultivo *in vitro* (Diez *et al.*, 2010).

El uso de esta técnica permite obtener ovocitos de hembras jóvenes, en gestación y 2 -3 semanas postparto con lo cual no se alteran los ciclos reproductivos de las hembras donantes (Herradón *et al.*, 2007), lo cual permite aumentar la productividad de hembra donadora/año, disminuir el intervalo generacional y aumentar la eficiencia reproductiva (Dhali *et al.*, 2009) (Pontes, 2011).

Así mismo, permite obtener embriones de hembras donantes de alta calidad genética con problemas de infertilidad o que no responden bien a los tratamientos superovulatorios (Ahuja *et al.*, 2009). La viabilidad de los embriones producidos por este método es similar a la obtenida de embriones producidos por los procedimientos de ovocitos recolectados en plantas de beneficio (Pontes, 2011), pero es

sensiblemente menor a la viabilidad de los embriones obtenidos a partir de otras biotecnologías reproductivas como la técnica tradicional de trasferecia embrionaria (Hincapié, 2010).

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido es una de las técnicas que más se utiliza en Colombia, en los procesos de obtención de ovocitos en animales vivos. En este aspecto, diversos autores coinciden en afirmar que los pasos generales para realizar la aspiración folicular transvaginal (OPU) son:

- a) Tranquilización previa de la hembra en pie, con Xilacina 2% por vía intramuscular (Salazar, 2005).
- b) Aplicación de anestesia epidural con Lidocaína 2% para mejorar manejo.
- c) Vaciamiento del recto, limpieza de vulva y periné (Serizier, 2011).
- d) Introducción del transductor de 5 a 7.5 Mhz vía vaginal junto con la guía y la aguja de punción desechable (20G, 0'9 x 70mm) conectada a un tubo estéril de 50ml (Block, 2011). Este equipo se completa mediante una bomba de vacío accionada mediante un pedal y calibrada para producir una aspiración constante de 50 – 53 mmHg (20ml/min) manteniendo el tubo de colecta atemperado a 37°C mediante baño termostático (Pontes, 2011).

- e) Posicionar los ovarios vía rectal delante de la sonda, para folículos de más de 3mm de diámetro. Previo a la punción se drena una pequeña porción del medio de recolección, recordando lavar todo el sistema de recolección cada vez que se hayan aspirado 3 – 4 folículos con PBS al que se le agregan 50 UI/ml de Heparina, 50 mg/ml de Gentamicina y 1% de Suero fetal Bovino (Pontes, 2011).
- f) El producto obtenido en cada tubo de 50ml de la recolección de cada animal debe ser filtrado, eliminando los restos de sangre con continuos lavados con suero fetal bovino (PBS), llevados posteriormente a una caja de Petri para localización y valoración morfológica de los complejos cumulus-ovocito (COCs) colectados mediante el uso del estereomicroscopio (Ruíz, 2010).
- g) Los ovocitos obtenidos son clasificados en cinco categorías dependiendo de su homogeneidad, citoplasma y compactibilidad de las células del cúmulo (Ruíz, 2010).
- **CATEGORÍA I:** Ovocitos con más de tres capas de células del cúmulo compactas y con citoplasma homogéneo uniformemente granulado.
 - **CATEGORÍA II:** Ovocitos con menos de tres capas de células del cúmulo y citoplasma generalmente homogéneo.
 - **CATEGORÍA III:** Ovocitos con una sola capa de células del cúmulo y citoplasma de aspecto irregular con áreas oscuras.

- **CATEGORÍA IV:** Ovocitos desnudos.
- **CATEGORÍA V:** Ovocitos maduros con cúmulo expandido.

3.2 Producción *in vitro*

Una vez colectados los ovocitos, es necesario desarrollar una serie de pasos o etapas a nivel del laboratorio con el fin de poder obtener embriones aptos para transferir. Ferreira (2010) señala las etapas clave en el proceso:

- Maduración de ovocitos bovinos.
- Capacitación de semen *in vitro*.
- Proceso de fertilización *in vitro* (FIV).
- Maduración *in vitro* de los embriones bovinos.
- Evaluación del clivaje y desarrollo embrionario en FIV.

Luego del proceso de maduración *in vitro* aproximadamente el 90% de los ovocitos que son puestos en el medio de cultivo se activan y logran alcanzar la metafase II, expulsando el primer cuerpo polar pasadas las 16 – 24 horas pos maduración (Block, 2011). De éstos, normalmente el 80% logra ser fecundado y comienza su proceso de división celular hasta alcanzar de 2 – 4 células, de los cuales únicamente de un 25 – 40% logra llegar al estado de Blastocisto (B) o de Blastocisto expandido (Bex) pasados 6 – 7 días (Ferreira, 2010).

Lo anterior muestra que el paso correspondiente al cultivo embrionario es donde se encuentra la mayor cantidad de pérdidas dentro del sistema de producción de embriones post FIV, lo cual define a su vez la calidad de los embriones a obtener (Felmer, 2006).

3.2.1 Maduración de ovocitos bovinos

El proceso de maduración de ovocitos bovinos comprende procesos altamente especializados, mediante el cual el ovocito evoluciona de profase a metafase promoviendo la maduración nuclear, donde en el ovocito se produce el proceso de división celular (meiosis) dado un aumento de la hormona luteinizante (LH), o también cuando es sometido al proceso de maduración *in vitro* (Block, 2011). Éste proceso se cumple en un periodo de 24 horas, donde el ovocito alcanza la maduración nuclear (metafase) y queda latente hasta el momento de ser fertilizado. En éste momento se da la formación pro nuclear; así mismo, es necesaria la maduración del citoplasma del ovocito, pues mediante ésta, el ovocito queda listo para ser fertilizado y logra aportar los elementos requeridos para el desarrollo embrionario (Ferreira, 2010).

El proceso de meiosis se inicia en el ovario de los fetos hembras y se detiene previo al nacimiento en la etapa de profase, donde detienen su desarrollo y se estancan en una fase llamada “reticulada”, que consiste en un estado de reposo del núcleo y queda así hasta la pubertad (Ferreira, 2010).

Dichos ovocitos inmaduros, y que entraron en reposo poseen un núcleo de gran tamaño que se llama vesícula germinal desde donde parte la meiosis desde profase hasta la metafase donde el primer cuerpo polar es expulsado al espacio perivitelino (Zarate, 2006).

En los últimos años, se han desarrollado diversos protocolos de estimulación ovárica en bovinos tendientes a aumentar la presencia de folículos de mayor diámetro al momento de la punción folicular con los que se han obtenido tasas de producción de embriones hasta un 80% (Orzuna, 2015). Sin embargo, esto incrementa los costos de la técnica por lo cual la mayoría de las veces se realiza la técnica sin una estimulación hormonal exógena.

La composición y metodologías utilizadas en los medios de cultivo, deben brindar un ambiente similar al proceso que ocurre de forma natural; las condiciones que son simuladas a nivel de laboratorio, se da por medio del uso de medios de cultivo como es el “Tissue Culture Medium-199 (TMC 199)” suplementado con Suero Fetal Bovino (SBF) al 10%, 5 µg/ml FSH, 50 µg/ml LH y 0.1 µg/ml de Estradiol que tiene un efecto favorable en el desarrollo post maduración, cubiertas con aceite mineral de acuerdo con el protocolo de Watanabe *et al.* (1998). Los ovocitos son incubados por 24 horas en atmósfera controlado con 5% de CO² y 100% de humedad” (INTA, 2010).

De los Reyes (1994), citado por Páez (2013) comenta que las gonadotropinas provocan un aumento significativo en la cantidad de AMPc en las células de la granulosa e inducen la maduración ovocitaria. La LH mejora las condiciones de maduración *in vitro*, modificando el ambiente nutricional ya que aumenta la energía disponible para el ovocito (Ferreira, 2010). Adicionalmente, impide los efectos inhibitorios que actúan sobre el gameto, logrando de ese modo la ruptura de la vesícula germinal. Por otro lado, la FSH induce la expansión de las células de cúmulo en bovinos, a través de la síntesis de piruvato y ácido hialurónico.

Se ha sugerido además que la FSH y el estradiol participarían en el bloqueo a la poliespermia durante la fecundación, a través de la síntesis previa de los gránulos corticales (De los Reyes, 1994). Una vez lavados y seleccionados los ovocitos, son posteriormente colocados en grupos de hasta 50 ovocitos por cada celda, en placas de cultivo, conteniendo medio de maduración.

3.2.2 Capacitación de semen *in vitro*

Como se evidencia en la tabla 1, en condiciones de reproducción natural, para lograr llevar a cabo éste proceso el espermatozoide necesita estar dentro del tracto reproductivo de la hembra por un periodo de entre 5 – 6 horas antes de adquirir su capacidad fertilizante (Ishimoto, 2015).

ESPECIE	CAPACITACION	MOTILIDAD	FERTILIDAD EN ESPERMAS	FERTILIDAD EN OVOCITOS
DURACION EN HORAS				
OVEJA	1-5	48	30-48	8-10
RATA	2-3	17	14	12
CERDO	2-3	50	24-48	8-10
CONEJO	5	43-50	28-36	6-8
VACA	5-6	15-48	24-48	8-12

TABLA 1. Tiempo requerido para la capacitación y duración de la motilidad espermática, y duración de la fertilidad de los gametos en diferentes especies.

(FUENTE: Dale y Eider, 1997 y Bearden y Fuquay, 1997)

En este lapso de tiempo, suceden cambios de tipo funcional en el espermatozoide, los cuales son conocidos como la capacitación espermática, el cual es un proceso dependiente de la temperatura, que solo se da entre los 37 – 39 °C (El-Sherry *et al*, 2014). Hunter *et al* (2011) menciona que el líquido folicular y el tracto reproductivo de la hembra proveen elementos necesarios para la maduración del ovocito, la capacitación y la fertilización. Adicional a esto, manifiestan que dicho tracto reproductivo contiene un factor de bajo peso molecular, que incrementa el metabolismo espermático y aumenta la motilidad mediante el decremento de los niveles de ATP y aumento en los del AMPc dentro del espermatozoide.

En bovinos se dan dos procesos fundamentales durante la capacitación espermática:

- En primer lugar, se da la remoción del plasma epididimal y seminal del espermatozoide, posteriormente se da una alteración en las glicoproteínas a nivel de membrana plasmática. Esto puede ser *in vivo* o *in vitro* por contacto

con las células del cumulus oophorus (CCO), lo que incrementa la velocidad flagelar y acelera el movimiento del espermatozoide (Hyakutake *et al.* 2015).

- Después de esto, el espermatozoide se pone en contacto con las CCO por un lapso de 2-3 horas, donde las células alteran los componentes de la superficie espermática por medio de las glicosidasas (Hyakutake *et al.*, 2015).

Durante el proceso de capacitación espermática también suceden procesos dentro de las células como un cambio en la concentración y el metabolismo del calcio (AMPC) donde se da una reacción acrosómica, produciendo la fragmentación y pérdida del acrosoma liberando ciertas enzimas hidrolíticas y proteasas (El-Sherry *et al.*, 2014).

Dicha reacción acrosómica implica la fusión de la membrana externa con la plasmática, con la posterior liberación del contenido acrosomal, que se une a la zona pelúcida mediante una glicoproteína (ZP3), y que se adhiere a la capa acrosomal llevando a cabo una reacción, que también es ayudada por medio del ácido hialurónico, el cual en presencia de hialuroquinasa presente en el acrosoma lleva a cabo dicha reacción acrosómica. Esta reacción es primordial en la activación del espermatozoide previa a la fusión de los dos gametos, lo cual ocurre entre 2 - 15 minutos *in vitro* en presencia de Ca^{++} (Hunter *et al.*, 2011).

A nivel del laboratorio, la capacitación espermática generalmente se logra exponiendo los espermatozoides vivos a concentraciones de heparina y cafeína (Hu, 2010). Estas sustancias logran estimular el proceso de capacitación del espermatozoide que lo prepara para interactuar y fecundar el óvulo (Foo, 2010).

Este tratamiento incluye la eliminación de todos los elementos presentes (plasma seminal, componentes del diluyente en caso de semen congelado-descongelado, contaminantes, etc.) excepto los espermatozoides y una selección de los espermatozoides vivos y con motilidad progresiva.

Esto se logra mediante técnicas basadas en la migración de los espermatozoides (swim up), la centrifugación en gradientes de densidad (percoll) y filtración (lana de vidrio). De estas las más utilizadas son el swim up y el percoll (Mucci, 2010).

3.2.3 Proceso de fertilización in vitro (FIV)

Para llevar a cabo este proceso se utiliza semen de pajillas descongeladas para tal fin, junto a la previa retirada de las placas de maduración de ovocitos, y según Mucci (2010) se siguen los siguientes pasos:

- i.** Cargar nuevas placas de cultivo con medio de fecundación. De acuerdo a este protocolo por cada celda se colocara 400µl de medio de fecundación (Tabla 2), soluciones salinas: tiroides lactato modificado (TALP), IVF-SOF (Fluido Sintético del Oviducto)(Caicedo, 2016); tablas 3, 4, 5 + 20µl de una solución de heparina diluida en medio de fecundación como inductor de la capacitación espermática (Tabla 6). Posteriormente, colocar en estas placas los ovocitos que fueron puestos a madurar el día anterior (Mucci, N. 2010).

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de sodio	315 mg
Cloruro de Potasio	26,8 mg
KH ₂ PO ₄	2 mg
Bicarbonato de sodio	105 mg
Penicilina	3,25 mg
Piruvato de Sodio	2,75 mg
BSA FAF	400 mg
Fructosa	4,5 mg
Cloruro de Calcio	12,6 mg
Aminoácidos	500 ul
Lactato de Sodio	23,5 ul
Agua ultra pura	50 ml

TABLA 2. Medio de IVF-SOF (50ml).
(FUENTE: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de sodio	666 ml
Cloruro de Potasio	23,5 mg
KH ₂ PO ₄	4,7 mg
Bicarbonato de sodio	210 mg
Penicilina	6,5 mg
Rojo Fenol	1 mg
Cloruro de Calcio	39,7 mg
Cloruro de Magnesio	10 mg
Lactato de Sodio	186 ul
Agua ultra pura	100 ml

TABLA 3. Medio de fecundación (FIV).
(FUENTE: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
FIV stock	10 ml
BSA	60 mg
Piruvato stock	100 ul

TABLA 4. Formulación final del medio de fecundación.
(FUENTE: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
Heparina	1 mg
Medio de Fecundación	1 ml

TABLA 5. Dilución de heparina para la fecundación.
(FUENTE: Mucci, N. 2010)

Por otro lado, Martínez (2016) manifestó que la adición de factor de crecimiento similar a la insulina tipo-I (IGF-I) a los medios de fertilización *in vitro* y cultivo de embriones ha sido propuesta como una forma de imitar las señales maternas de la gestación temprana en el útero. En dicho estudio también manifiestan que, se utilizó semen sexado de tres toros Holstein para la fertilización *in vitro* (FIV), de ovocitos obtenidos de ovarios recolectados en plantas de sacrificio, para lo cual se agregó IGF-I (100 ng/ml) en los medios de fertilización y desarrollo embrionario a diferentes tiempos: T1 (IGF-I, d 0-7; n= 393); T2 (IGF-I, d 0-3; n= 394); T3 (IGF-I, d 3-7; n= 394); y T4 (sin IGF-I o grupo control; n= 394).

Se evaluó el porcentaje de fertilización al día tres de incubación y el día siete se evaluó la calidad y estadio de los blastocistos. Los datos se analizaron con el procedimiento CATMOD de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), ajustando un modelo que incluyó el efecto de tratamiento (con y sin IGF-I, para tasa de fertilización; y T1, T2, T3 y T4 para otras variables). La adición de IGF-I al medio afectó la tasa de fertilización (34 vs 42%; $P < 0.05$) y no hubo efecto ($P > 0.05$) de tratamiento para la tasa de blastocistos/ovocitos fertilizados, ni para calidad de los blastocistos, donde en dicho estudio se concluye que la adición de IGF-I a los medios de fertilización y cultivo *in vitro* no tiene un efecto benéfico para la producción de embriones, pero sí afecta la fertilidad del semen sexado.

- ii.** Si el semen está congelado en pajillas en N₂ líquido, la misma deberá descongelarse en un baño maría a 30°C, durante 30 segundos. Posteriormente, una vez secada la pajilla se efectuará el corte de uno de sus extremos y se lo introducirá en un tubo de 5ml estéril. Luego se efectuará el corte del otro extremo y se descargará de este modo la columna de semen dentro del recipiente estéril (Mucci, N. 2010).
- iii.** Independientemente de la forma de la presentación del semen este deberá ser acondicionado con el propósito de eliminar diluyentes, células muertas, etc. (Mucci, 2010).
- iv.** Una vez obtenida la suspensión de espermatozoides libre de diluyentes y células muertas, se procede a la determinación de la concentración espermática para efectuar la fecundación con la dosis requerida (Mucci, N. 2010).
- v.** Preparar la cámara de Neubauer para realizar el conteo de espermatozoides (colocar un cubre objetos) (Mucci, 2010), ó, un método alternativo como recuento con fotómetro (Rivera, 2013).
- vi.** Diluir la suspensión de espermatozoides al 5% en agua. Tomar 95 µl de agua y agregarle 5 µl de la suspensión de semen obtenida luego de la última centrifugación. Homogenizar y cargar la cámara para efectuar el conteo (Mucci, 2010).
- vii.** Llevar al microscopio y contar 5 cuadrados de doble borde (x400) (Mucci, 2010).

- viii.** Cálculo para la fecundación: cálculo que contempla la dilución efectuada sobre la muestra espermática dividido por el número de espermatozoides que se contaron (Guimarães. 2012). El resultado corresponde al volumen en μl que se debe tomar del tubo que contiene los espermatozoides para fertilizar con un millón de espermatozoides por mililitro de dosis inseminante (Mucci, 2010). Se efectúa la dilución y el conteo de los espermatozoides motiles para alcanzar habitualmente una dosis inseminante de 1-6 millones de espermatozoides por ml de medio de fecundación.
- ix.** Colocar en cada celda de la placa de cultivo la cantidad de semen correspondiente y llevarlas a estufa durante 24hs (Guimarães. 2012). La dosis espermática es generalmente de 1-2 millones de espermatozoides por ml de medio (Mucci, 2010).

3.2.4 Maduración in vitro de los embriones bovinos

Los embriones que lograron sobrepasar la etapa anterior, y sobrepasaron la etapa de 4 o más células, son llevados del medio de fecundación al medio de cultivo donde pueden proseguir con su división celular, hasta llegar a mórulas y blastocistos (Guimarães, 2012), en donde los embriones pueden ser transferidos a hembras receptoras (en fresco), o congelados para su posterior uso mediante criopreservación (Gadelha, 2010), etapa donde se usan en dicho medio varias fuentes de energía como glucosa, aminoácidos esenciales y no esenciales (Gadelha, 2010).

La clasificación actual de los medios de cultivo manejada en Colombia, y que se apega a la norma internacional se puede dividir en tres grupos (INTA. 2004):

- i. Indefinidos:** Cuando se utiliza suero fetal bovino en co-cultivo con células somáticas, pero dificulta el conocimiento de las necesidades de los embriones durante sus etapas de desarrollo temprano y conllevan un riesgo de incorporar patógenos durante el cultivo (Herradón *et al.*, 2007).
- ii. Semidefinidos:** Cuando se omite el co-cultivo y el suero fetal bovino se reemplaza por albúmina sérica (Guimarães. 2012).
- iii. Definidos:** Cuando el suero se reemplaza por macromoléculas como el polivinil alcohol o la polivinil pirrolidona.

La clasificación de los sistemas de cultivo se puede dar de la siguiente manera (INTA, 2010):

- i. Co-cultivo:** Se refiere a la mezcla del medio de los embriones con células somáticas (células de la granulosa, oviductales), las cuales tendrían la capacidad de producir y liberar al medio diversos elementos (hormonas, factores de crecimiento), para mejorar el desarrollo del embrión, reducir la presencia de sustancias dañinas y reducir la tensión del O₂ del medio embrionario (INTA, 2010).

- ii. Definidos y no definidos:** Donde se puede conocer o no los compuestos utilizados en los medios de cultivo, pero tienen grandes limitantes, el conocer la composición de dichos medios ayuda a determinar los requerimientos de los embriones en sus diversas etapas de desarrollo (INTA, 2010).
- iii. Secuenciales:** Donde no se efectúan cambios durante todo el cultivo.
- iv. No secuenciales:** Donde la composición del medio de cultivo va siendo modificada adicionando o cambiando totalmente con base en los requerimientos de los embriones o para desechar residuos de su metabolismo fisiológico normal (INTA, 2010).

Pasadas 24 horas de la FIV se debe hacer la denudación de los cigotos para retirar el cumulus, lavar en medio de cultivo y colocados en placas de maduración (co-cultivo con células de la granulosa) o en nuevas placas (sin co-cultivo) (Guimarães. 2012), donde se colocan en una estufa a 38.5 °C en una atmósfera de 5% de O₂, 90% de N₂ y humedad a saturación hasta 48-72hs, donde se cuentan los ovocitos que se han dividido y se continúa el cultivo hasta el día séptimo donde están aptos para transferencia o criopreservación (INTA, 2010).

- a)** Se procede a verificar la placa de maduración para descartar contaminantes, se aspira el contenido y se reemplaza por 400 µl de medio de cultivo (TABLA 6 y 7) (Solís, P. 2015). En caso de no efectuar co-cultivo con células de la granulosa se procederá al llenado de nuevas placas (Mucci, 2010).

COMPONENTES	UNIDADES
Cloruro de Sodio	670,32 mg
Bicarbonato de Sodio	220,11 mg
Cloruro de Potasio	23,11 mg
Rojo Fenol	1 mg
Lactato de Calcio	63,55 mg
Piruvato de Calcio	4 mg
Agua Ultra pura	100 ml

TABLA 6. Medio de cultivo CR1 Stock para cultivo de embriones.
(FUENTE: Mucci, 2010)

COMPONENTES	UNIDADES
CR1 stock	9,7 ml
BSA	30 mg
BME (aa no esenciales)	200 ul
MEM (aa esenciales)	100 ul
Glutamina	1,5 mg

TABLA 7. Formulación final del medio de cultivo CR1 suplementado con 3mg/ml de BSA y aminoácidos (aa).
(FUENTE: Mucci, 2010)

- b)** Preparar la pipeta con capilar de vidrio necesaria para el manejo de los embriones (Bermejo, 2010).
- c)** Se procede a aplicar 400 μ l de medio de cultivo en un tubo de centrifuga, se pasan los cigotos por este para desempacarlos por agitación mecánica utilizando un vortex durante 1,5 minutos o mediante la utilización de micropipetas (Solís, 2015).
- d)** Después de esto se lavan las paredes del tubo con medio de cultivo, se aspira y se deposita en una placa de búsqueda, donde se agregan 400 μ l de medio de cultivo en el tubo y se vuelve a enjuagar (Solís, 2015). Posteriormente, se

realiza la búsqueda y el lavado de los cigotos mediante el pasaje a través de gotas de medio de cultivo (Mucci, 2010).

- e) Hay que aclarar que se deben hacer varios lavados y búsquedas del tubo hasta no encontrar más cigotos (Bermejo, 2010), donde una vez lavados y seleccionados se colocan en una placa de cultivo.

- f) Se introduce dicha placa en la estufa y se procede a establecer el cultivo bajo las condiciones ya mencionadas (estufa a 38.5 °C, atmosfera de 5% de O₂, 5% de CO₂, humedad a saturación hasta 48-72hs) (Urrego *et al.*, 2008).

- g) Posteriormente se continúa con el cultivo hasta el día 7 donde se evalúa el porcentaje de producción de embriones en sus diferentes estadios (Mamo, 2011) y se procede a su transferencia o criopreservación (INTA, 2010).

3.2.5 Desarrollo embrionario en FIV

Según lo establece la International Embryo Technology Society (IETS), la clasificación de la integridad morfofisiológica embrionaria se puede hacer de la siguiente manera:

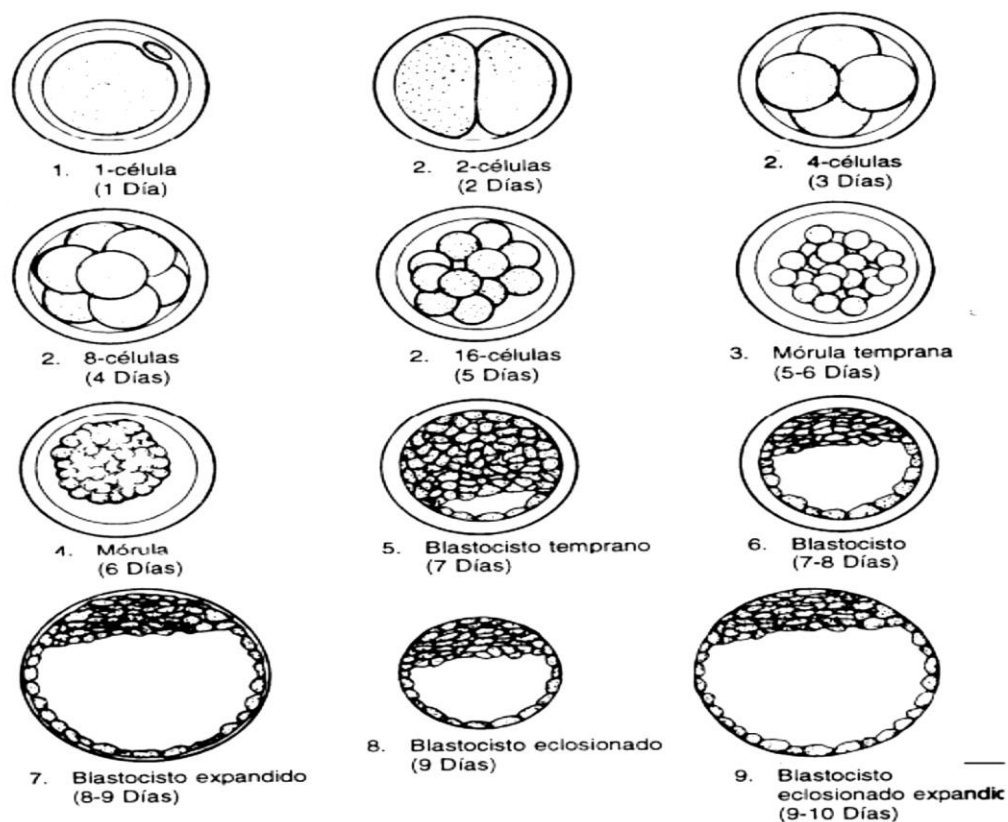


FIGURA 1. Clasificación de los embriones según normas IETS.
(FUENTE: De la Fuente, 2012)

“El código para el grado de desarrollo es numérico. El número 1 significa un ovocito sin fecundar o un embrión de una célula. El número 2 identifica embriones con 2 a 16 células (Räty, 2011). El número 3 identifica una mórula temprana, y los números 4 a 9 identifican a los embriones en estadios posteriores a la compactación”, y así sucesivamente como se puede apreciar en la tabla 8 (De la Fuente, 2012).

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

TABLA 8. Clasificación de los embriones según normas IETS.
(FUENTE: De la Fuente, 2012)

Calidad embrionaria:

- **Excelente (1):** Embrión redondo, simétrico, blastómeros uniformes, intactos y viables, zona pelúcida con superficies lisas, sin concavidades ni malformaciones (Mamo, 2011).
- **Bueno (2):** Irregularidades moderadas, el 50% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
- **Regular (3):** Forma y tamaño de la masa embrionaria, así como en el tamaño, color y densidad de células individuales irregulares. Al menos el 25% del material celular deberá encontrarse intacto y correspondería con una masa embrionaria viable.
- **Malo (4):** Muerto o degenerado, ovocito de 1 célula, no viables.

3.3 Componentes de los medios de cultivo

3.3.1 *Parámetros biofísicos y elementos inorgánicos*

Tras una exhaustiva revisión literaria, diversos investigadores coinciden en manifestar que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos fundamentales para ser tenidos en cuenta por su relevante importancia en el proceso son:

- **Osmolaridad:** Según los valores promedio obtenidos de secreciones uterinas, el valor optimo ronda los 280 mOsm/kg (Räty, 2011).
- **pH:** Se han obtenido los mejores resultados en pH neutro a alcalino, encontrándose en un rango de entre 7,2 a 7,6 (Orzuna, 2015).
- **CO₂ / O₂:** Los parámetros de gases más exitosa es 5% CO₂ en aire en la fase de maduración de ovocitos y la FIV, y de 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ en la fase de desarrollo embrionario (Orzuna, 2015).
- **Fluido de oviducto:** Sus características proporcionan bajas concentraciones de sodio y altas concentraciones de potasio, los cuales deben ser balanceados muy bien, al igual que otros elementos básicos como bicarbonatos, sulfatos y fosfatos (Räty, 2011).
- **H₂O:** Se considera el componente básico del medio de cultivo, y el desarrollo embrionario está relacionado de una forma directamente proporcional con el grado de pureza de la misma. Mucci (2010) recomienda no almacenar durante mucho tiempo el agua destinada para los medios de cultivo, pues los contenedores pueden soltar residuos que pueden contaminarla (Orzuna, 2015).

3.3.2 *Compuestos orgánicos*

En los últimos años en Colombia se han registrado diversas investigaciones que revelan el efecto de variadas hormonas, macromoléculas y factores promotores de crecimiento embrionario en bovinos (Bermejo, 2010), los cuales presentan diversos resultados, y que adicionalmente no siempre tienen buenos resultados, lo que afecta los procesos de investigación, pero en los cuales siempre son constantes con el uso de dos compuestos fundamentales para dicho fin, según Orzuna (2015) éstos son:

- **Fuente de energía:** Para el establecimiento del medio de cultivo y maduración de los embriones producidos mediante la FIV, es esencial el uso de lactato, piruvato y glucosa como fuente de energía (Bermejo, 2010). Éstos son utilizados por los embriones en las primeras etapas junto a la glutamina como fuente principal de energía (Bernal, 2011); en dado caso se genera un aumento en el consumo de glucosa en estadíos mayores de desarrollo embrionario (Gonella *et al.*, 2013). También tiene incidencia en la síntesis de precursores de ADN, ARN y lípidos, lo cual lo hace importante al momento de la eclosión fuera de la zona pelúcida (Orzuna, 2015).
- **Fuente de proteína:** Los aminoácidos son de suma importancia en los medios de cultivo y desarrollo embrionario (Bernal, 2011), ya que son fuente de energía, actúan como buffer dentro de las células y en síntesis proteica, las cuales son

mediados por transportadores a nivel de membrana dependiendo de la fase de desarrollo, ó como respuesta a estímulos del medio de desarrollo (Orzuna, 2015).

Los aminoácidos no esenciales influyen en el desarrollo en fases iniciales (Bernal, 2011), los aminoácidos esenciales lo hacen en embriones de desarrollo mayor (8 células o más), lo cual es en respuesta a necesidades específicas del embrión (Felmer, 2006). Adicionalmente, a éstos aminoácidos se les hace una suplementación proteica con suero fetal bovino o albúmina sérica bovina (BSA) en el medio de cultivo y de desarrollo (Bermejo, 2010). Dichos suplementos presentan diversos beneficios como la protección de los embriones a tóxicos, aporta factores de crecimiento y hormonas, disminuye la tensión superficial del medio de cultivo, evita adherencias de los embriones (Mamo, 2011), utilidad que todavía se cuestiona, pues tanto la tasa de producción, como el número de células embrionarias no fueron afectados por la presencia o ausencia de suero (Orzuna, 2015).

Igualmente, con la suplementación de sueros en los medios de cultivo se generan efectos negativos como alteraciones mitocondriales, exceso de producción de ácido láctico, aumento de células apoptóticas; así como, alteraciones en los periodos de gestación de las hembras receptoras de dichos embriones (Rodríguez, 2012). También se presentan terneros nacidos con mayor peso de lo normal, lo cual puede ser explicado en estudios recientes, donde indican que la presencia de suero puede disminuir la expresión de genes, que son

de particular importancia para el desarrollo embrionario temprano como el de la conexina 43, y para el reconocimiento materno de la preñez como el interferón r (Orzuna, 2015).

Adicionalmente, en recientes investigaciones, se ha llegado a la conclusión que los embriones producidos en medios adicionados con suero presentan una mayor cantidad de lípidos (Bernal, 2011). Esto contribuye a que exista una mayor sensibilidad al proceso de criopreservación, y aumenta el riesgo de contaminación del medio de cultivo (Rodríguez, 2012). Por dicha razón, en algunos casos se usan polímeros sintéticos como el alcohol polivinílico, la polivinilpirrolidona, o el hialuronato, los cuales han demostrado proveer una buena actividad surfactante, similar a la albumina (Sánchez, 2014).

4. FERTILIZACIÓN *in vitro* EN COLOMBIA

La fertilización *in vitro*, se ha convertido en el transcurso de los últimos años en una biotecnología cada vez más asequible para los productores bovinos de Colombia, ya que gracias al incremento en su implementación en diversos sistemas productivos, y a la existencia de empresas y laboratorios nacionales e internacionales que hacen presencia en el país, hay un incremento en el número de profesionales especializados en el área, y se ha logrado la disminución de los costos para acceder a ella, para poder aprovechar sus bondades en la ganadería bovina, donde puede contribuir de gran manera en mejorar la calidad de vida de los productores pecuarios bovinos del país.

Bajo estas circunstancias, vale la pena resaltar el caso de Argentina, donde la FIV se ha implementado con gran éxito; esta técnica se ha usado de forma intensiva desde hace más de 20 años, dando excelentes resultados en la producción bovina. Según el grupo de investigación del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de agronomía de la Universidad de Buenos Aires, durante una conferencia, ofrecida en el Congreso Tecnológico CREA, informó que la FIV sigue generando resultados positivos en la productividad ganadera después de tantos años desde su inicio.

Gracias al avance y desarrollo de la técnica, se ha abierto el mercado para la comercialización de embriones en doble vía desde y hacia Brasil, ésto luego de un trabajo conjunto entre el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa) de Argentina y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA) de Brasil,

garantizando así las condiciones sanitarias apropiadas para el comercio internacional, establecidas por la Organización Mundial de la Sanidad Animal.

Colombia puede tomar el ejemplo del caso argentino, con el fin de incrementar la utilización de esta biotecnología en los programas reproductivos de los sistemas ganaderos bovinos, actualmente solo se cuenta con alrededor de 15 centrales productoras de embriones certificadas por el Instituto Colombiano Agropecuario en todo el territorio colombiano, como son Ctelca, CGR, Cryogen, Embriocell, Embriones Del Sinú, Vitrogen, Empresa Genética Especial E.G.E., Central de Biotecnología Reproductiva Bovina de la Regional Cesar y el Laboratorio de Reproducción bovina de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, entre otras. Las anteriores empresas y laboratorios, mediante la utilización de técnicas brasileras, americanas y europeas, junto con el apoyo de entidades académicas como el Instituto de Reproducción Animal Córdoba –IRAC de Argentina, han participado de manera definitiva en la capacitación de profesionales, difusión y aplicación de la FIV.

En los proyectos biotecnológicos que funcionan actualmente impulsados por las diferentes federaciones de ganaderos del país, se muestra que la FIV disminuye las brechas generacionales, al tener resultados de mejoramiento genético en la primera descendencia bovina, lo que representa ahorro en tiempo e inversión por la mejora en los resultados en producción de leche y carne, con lo que se podría convertir en una buena alternativa para los ganaderos de Colombia, generando la posibilidad de acceder a ella a un costo más bajo en comparación con años anteriores.

En Colombia se han llevado a cabo en la última década, algunos estudios de tipo científico con el fin de mejorar la viabilidad de la técnica de FIV en bovinos, como por ejemplo, lo reporta Urrego (2008), quien realizó un estudio sobre la simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. El objetivo de dicho estudio fue “evaluar un nuevo procedimiento de fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos bovinos, en el cual se omitió la centrifugación de los espermatozoides para los procesos de lavado y selección espermática. Dentro de cada uno de los pozos de los platos convencionales de cuatro pozos (pozos externos) se introdujo un nuevo pozo más pequeño (pozos internos) de aproximadamente 50 μ l hecho en material de vidrio (0.3 mm de alto por 0.8 mm de diámetro).

El procedimiento consistió en llenar los pozos interno y externo con 700 μ l de medio de fertilización, hasta que el pozo interno quedara cubierto de medio, luego se depositaron 10 CCOs por pozo interno; luego 30 μ l de semen previamente descongelado se depositaron en el fondo del pozo externo. Después de una hora se removió todo el contenido del pozo externo y se dejó el contenido del pozo interno con el medio y las células germinales por un periodo de incubación de 16 h. Los presuntos cigotos fueron cultivados en medio CR1aa por un periodo de siete días con un cambio de medio a las 72h. Como control, se utilizó un gradiente de Percoll 45-90% para la selección espermática.

La tasa de ovocitos divididos fue de (70.8 vs. 73.1) y la proporción de ovocitos que llegaron al estadio de mórula y blastocisto fue de (18.8 vs. 20.3), respectivamente. Los resultados obtenidos con la nueva propuesta metodológica son similares a los obtenidos con

la metodología convencional ($p < 0.05$). Estos resultados indican que ambos métodos producen resultados similares pero la nueva propuesta metodológica permite ahorrar tiempo, es menos laboriosa, consume menos reactivos y permite reducir la manipulación de las células espermáticas con buenos efectos eventuales en el mejoramiento de los procedimientos de reproducción *in vitro*.

En este aspecto, es importante señalar que al eliminar el proceso de centrifugación espermática se puede reducir procesos de disfunción espermática iatrogénica (Álvarez, 2005) que pueden disminuir la capacidad fértil de los espermatozoides, constituyéndose en una buena alternativa para mejorar los resultados en los procesos de fertilización *in vitro*.

Así mismo, Gómez (2013) investigó sobre el efecto del ácido linoleico conjugado sobre la proporción de los géneros y la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*; desarrollaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la suplementación del medio de cultivo con ácido linoleico conjugado (CLA) sobre el clivaje, producción, proporción de machos y hembras y la calidad embrionaria al día 7 de cultivo. Los resultados no evidenciaron diferencias significativas en la proporción de sexos para ninguno de los estadios en el grupo suplementado con CLA; sin embargo, se igualó la proporción natural esperada (50:50), mientras que en el control hubo mayor cantidad de machos, al observar el total de los estadios. El CLA mejoró calidad en el estadio de Blastocisto (B1) para las hembras y Blastocisto temprano (Bt) para los machos ($P < 0,05$), teniendo un mayor número de embriones grado 1 en los embriones suplementados, mientras que el control presentó más embriones grado 2. En conclusión, el CLA afecta negativamente la producción de embriones

bovinos *in vitro*, pero iguala la proporción de sexos a la natural en el total de estadios y mejora calidad en algunos estadios del desarrollo temprano. Existen reportes en la literatura que señalan que el ácido linoléico puede mejorar la resistencia a la manipulación y supervivencia de los embriones (Meza *et al.*, 2014), lo cual puede mejorar significativamente las tasas de preñez obtenidas.

Julio Olaya, gerente de la empresa Embriogén, una de las empresas que desarrollan la técnica, menciona en una publicación de la revista colombiana Contexto Ganadero (2014), que del 100 % de los embriones que se producen en Colombia, el 70 % es para cruces de ganado comercial y el resto puro, asegurando que antes el ganadero con más capacidad económica era quien tenía posibilidad de invertir en la fertilización *in vitro*, pero gracias a la apertura de nuevos laboratorios de biotecnología reproductiva, junto a un aumento en el acceso a material genético proveniente de Canadá, Estados Unidos y Argentina, y de profesionales capacitados para hacer el trabajo de fecundación con hembras receptoras, se ha facilitado ésta labor, disminuyendo los recursos necesarios para implementarla. Esto se ha visto reflejado en el incremento progresivo en la implementación de la técnica durante los últimos años.

No obstante, se hace necesario seguir fortaleciendo el apoyo al desarrollo de estos programas que hacen uso de las herramientas de biotecnología con el fin de contribuir a los programas de mejoramiento genético bovino, ya que, si bien se observa un aumento de la utilización de estas herramientas, aún el país se encuentra por debajo de los resultados

obtenidos por otros países en el continente como Argentina y Brasil donde la técnica ha tenido un crecimiento continuo en su implementación en la ganadería bovina.

4.1 Estado de la técnica

El uso de la biotecnología como herramienta de mejoramiento genético, y más concretamente la fertilización *in vitro* (FIV), representa un gran avance en la producción y reproducción bovina en Colombia, llegando incluso a mejorar los resultados obtenidos por la inseminación artificial y la transferencia de embriones (Hernández, 2004), propiciando la mejora en la productividad del sector bovino, al aumentar su eficiencia y poner una gran herramienta a disposición del ganadero (Fernández *et al.*, 1997).

La FIV se muestra entonces, como una herramienta de biotecnología con bastantes ventajas en el momento de su implementación en programas de mejoramiento con animales que poseen un gran valor genotípico y fenotípico (Block, 2011), pues con su implementación se puede mejorar la eficiencia reproductiva, gracias a la obtención de un mayor número de embriones en comparación con otras biotecnologías reproductivas (Leivas, 2011).

Esta herramienta se convierte en una excelente opción para ser usada en Colombia, sobre todo con animales que no sería factible usar con otro tipo de procedimientos ni de biotecnologías (Guzmán *et al.*, 2008), como lo son aquellos animales que no responden bien a los tratamientos de superovulación, que la viabilidad de los embriones producidos mediante superovulación y TE es muy pobre, hembras bovinas con patologías anatómicas que alteren

su capacidad de fecundación e implantación del embrión (Leivas, 2011). También en vacas de excelente genética destinadas a desecho o sacrificio, vacas o novillas que se encuentren en el primer tercio de la gestación, animales en puerperio o terneras pre púberes, entre otras indicaciones (Báez *et al.*, 2010).

La técnica de fertilización *in vitro* implica un proceso que tiene diferentes etapas, las cuales son la obtención de ovocitos, la maduración de ovocitos, la capacitación de semen *in vitro*, la fertilización *in vitro* como tal, la maduración *in vitro* y la transferencia de embriones (Block, 2011).

5. PROYECCIONES Y PERSPECTIVAS

La biotecnología reproductiva provee múltiples herramientas que pueden contribuir al mejoramiento de la producción bovina en Colombia, a fin de atender las demandas del consumidor colombiano dentro de las limitaciones económicas que actualmente tiene dicho consumidor, las restricciones ambientales que será necesario implementar para la sustentabilidad del sistema productivo ganadero de nuestro país y las consideraciones éticas impuestas por la sociedad.

La biotecnología reproductiva, especialmente la FIV contribuye a la producción bovina mejorando los componentes ambientales de los sistemas de producción, los márgenes de rentabilidad para los productores, así como el fenotipo y el genotipo del hato ganadero colombiano.

En Colombia el uso de la Fertilización *in vitro* en la producción ganadera bovina, ha ido en crecimiento durante los últimos años, sin embargo, aún estamos distantes de países como Estados Unidos, Brasil y Argentina, en donde la producción se ha incrementado de gran manera permitiendo el posicionamiento de la producción bovina de estos países en el mercado mundial.

Es importante señalar que existen pocas publicaciones referentes a los resultados obtenidos con esta técnica en Colombia, la mayoría de trabajos relacionados con la técnica de la FIV se dan a nivel comercial, y muy pocos a nivel académico e investigativo, sin embargo,

cifras no publicadas dan cuenta de que las tasas de preñez obtenidas con embriones producidos *in vitro*, pueden estar alrededor del 35-40%, siendo un resultado bueno, teniendo en cuenta que las tasas de recuperación ovocitaria están alrededor de los 10-15 ovocitos por colecta. Estos datos indican que la técnica de FIV puede constituirse en una alternativa para mejorar la eficiencia reproductiva de las explotaciones bovinas del país. Sumado a esto, el número de profesionales y empresas especializadas en la técnica se ha incrementado exponencialmente, pasando de 1 o 2 empresas hace 20 años, a más de 15 empresas en la actualidad, lo cual denota la importancia y el potencial que representa la misma en el país.

En el marco de lo anterior, se ve la necesidad de promover el uso la implementación de esta técnica en el país como herramienta de mejoramiento genético, así mismo implementar nuevas plataformas y herramientas biotecnológicas que permitan seleccionar embriones de alto valor genético previo a la implantación en la hembra receptora, lo que hace necesario un análisis genómico individual de cada embrión obtenido mediante la FIV. Lo anterior sería el escenario ideal, sin embargo, aún se tiene muchas limitaciones para estos procesos en el país, por lo cual la mayoría de los embriones obtenidos únicamente son evaluados a nivel morfológico y estructural para determinar su calidad, pero son escasos o en su mayoría no se realizan análisis genómicos para garantizar su calidad genética.

Dentro de este marco, es importante señalar que, en otros países como México, en el laboratorio de fertilización *in vitro* de la facultad de zootecnia y ecología de la UACH se ha desarrollado un método de cultivo celular individual que permite tener los embriones en

grupo, pero al mismo tiempo permanecen separados, organizados e identificados, con lo cual se puede hacer un análisis genómico a cada embrión.

Con la implementación de estas nuevas técnicas se pueden utilizar marcadores genéticos indicadores de fenotipos y genotipos deseados para producción y reproducción, generando embriones a nivel de laboratorio seleccionados genéticamente para poder asegurar que dicho embrión podrá producir en cantidad de carne y en cantidad de leche, además de ser muy fértil y presentar una reducida predilección por enfermedades presentes en la zona de ubicación del productor bovino, y siendo accesible para el mismo, logrando de ésta manera lograr tener exactitud de la selección, disminuir el intervalo entre generaciones, y mejorar la intensidad de la selección.

Todo esto debe sobrepasar una serie de limitantes, que son debidas a la naturaleza propia de la aplicabilidad de dichas biotecnologías, como puede ser una creciente desconfianza y temor respecto de la biotecnología en el público en general, la escasez de científicos y técnicos suficientemente capacitados y la falta de apoyo a los proyectos destinados a aplicar la biotecnología a la producción ganadera, así como las dudas en cuanto a la rentabilidad de las biotecnologías reproductivas aplicadas a la producción animal.

Si bien, Colombia tiene una baja participación en cuanto al número de embriones producidos a nivel mundial, se observa como ha ocurrido un incremento en la implementación de esta biotecnología durante los últimos años, gracias al aumento de productores ganaderos que implementan la técnica, el número de empresas y profesionales

que desarrollan la técnica en el país, y la disminución de costos del proceso, lo cual ha facilitado su implementación y con ello el incremento del uso de esta técnica en Colombia. Sumado a esto, existen políticas a nivel del país que buscan incrementar el número de cabezas de ganado como el denominado Plan estratégico de la Ganadería- PEGA-2019, con el que se espera alcanzar una cifra aproximada de 56 millones de cabezas de ganado bovino al año 2019, constituyendo la FIV una de las herramientas que pueden contribuir con estas metas de incremento en el número de bovinos en el país.

La oportunidad que se ofrece a los ganaderos con bovinos de excelentes cualidades, en cuanto a genotipo y fenotipo, para reproducir dicha genética, que ostenta grandes bondades, se convierte en una gran oportunidad de negocio a la cual pueden acudir para obtener grandes rendimientos, al igual que ayudar a mejorar la rentabilidad y sustentabilidad de las explotaciones ganaderas de otros empresarios y de esta manera aumentar los indicadores productivos de las empresas ganaderas del país.

No obstante, y de acuerdo a los avances que se han visto en la técnica de FIV en Colombia, también pueden acceder a la compra de ovocitos bovinos de muy buena procedencia para fecundarlos a nivel de laboratorio, lo que convierte a la FIV en un proceso cada vez más sencillo y viable para los empresarios y campesinos que deseen obtener nuevas generaciones de bovinos con mejor productividad, con los cual se logra dinamizar las negociaciones entre diversos predios para acceder a las bondades genéticas de los diversos ejemplares.

De acuerdo con César Portilla Luna, zootecnista, especialista en reproducción bovina y docente del área de reproducción de la Universidad de Pamplona en Norte de Santander, “La técnica más usada hoy en día es la de producción de embriones *in vitro* porque es más económica que la convencional. La razón es que no requiere el uso de hormonas para superovular ni nada por el estilo. Solo se debe aspirar la hembra, retirar los ovocitos, enviarlos al laboratorio para realizar el proceso de FIV, en donde pueden cobrar más o menos \$180.000 pesos por embrión producido”, a diferencia de los valores asociados al método tradicional de superovulación, que según manifiesta Portilla “el solo material tiene un costo de \$400.000 pesos por cada animal que se someta a esa técnica. A eso se le deben sumar los medios para hacer el lavado y los equipos que valen \$300.000 pesos, y puede llegar todo el proceso hasta un valor de \$2'000.000 de pesos con confirmación de la preñez a los 90 días”, esto dependiendo de la raza y la genética que el ganadero desee adquirir.

6. VENTAJAS Y DESVENTAJAS

- **Ventajas:**

- ✓ La FIV representa un gran avance, pues es posible obtener varios embriones de una sola vaca de alto valor genético maximizando sus capacidades.
- ✓ Alta capacidad de almacenamiento de material biológico de diversas especies animales por tiempo indefinido sin pérdida funcional de la actividad y las funciones genéticas.
- ✓ Aumentar el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético, ya que este procedimiento permite obtener ovocitos en novillas de más de 6 meses de edad y en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las 2-3 semanas del posparto (Galli *et al*, 2001).
- ✓ No interfiere con los ciclos productivos o reproductivos de la hembra donante y evita la necesidad de utilizar gonadotropinas.
- ✓ Permite transferir embriones de razas cárnicas en vacas de aptitud láctea no destinadas a la cría.

- ✓ Tratar la infertilidad derivada de problemas de ovulación, fecundación o mortalidad embrionaria precoz.
- ✓ Permite obtener descendencia de hembras de elevada calidad la genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los programas de erradicación de enfermedades infecciosas (Orzuna, 2015).
- ✓ La evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos.
- ✓ la difusión del uso de semen valioso y escaso, permite obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por erradicación de enfermedades y la prolongación de la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, inmaduros o muy viejos (Peláez, 2011).
- ✓ Eleva el rendimiento de producción de embriones en hembras de alto valor genético, se pueden obtener ovocitos de novillas a una edad de 6 meses, en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las dos a tres semanas de posparto (García, 2013).
- ✓ Permite el aprovechamiento de machos con oligospermias severas y de hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital.
- ✓ Aumenta la eficiencia de los procedimientos de selección, mediante la aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variantes alélicas de algunos genes de interés productivo.

✓ Facilita la utilización de semen sexado.

- **Desventajas:**

✓ Los ovocitos disponibles en el ovario son limitados, no se renuevan, disminuyen con el tiempo.

✓ Es necesario extraer los ovocitos del interior del trato reproductivo femenino y extraer el semen del tracto reproductor del macho para el proceso de la FIV.

✓ La calidad de los ovocitos es muy variada.

✓ Altos costos para su aplicabilidad, necesidades de equipos especiales.

✓ Alta mortandad de embriones producidos mediante FIV posterior a la criopreservación (Orzuna, 2015).

✓ Tiene un bajo rendimiento, el porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles se encuentra entre el 30 y 40% (Orzuna, 2015).

✓ Los embriones producidos *in vitro* son de menor calidad que los obtenidos *in vivo*.

✓ Incremento de la mortalidad embrionaria, abortos, problemas gestacionales como el hidroalantoides y alargamiento de la gestación (Orzuna, 2015).

- ✓ Nacimiento de terneros muy voluminosos, con anomalías estructurales y funcionales, conocido con el nombre de síndrome de exceso de volumen fetal, que disminuyen el vigor de los animales en el momento de su nacimiento y provocan una mayor mortalidad peri natal. Incremento del porcentaje de distocias por exceso de volumen fetal (Orzuna, 2015).

7. CONCLUSIONES

- a) La fertilización *in vitro* es una biotecnología con un gran valor en el ámbito científico y muy útil en investigación y la producción bovina en Colombia.
- b) La FIV posee una baja eficiencia y baja supervivencia después de la criopreservación.
- c) Es una técnica muy útil para conservar material genético valioso luego de que el animal ha muerto.
- d) Una de las grandes limitantes que evita la difusión masiva de esta biotecnología en nuestro medio, es el alto costo de los equipos para implementar un laboratorio.
- e) Los factores no controlados en la recuperación de ovarios de los mataderos, tales como hormonales, sanitarios y/o nutricionales, pueden influir en la calidad de los ovocitos obtenidos para la FIV.
- f) Es evidente que se precisa una serie de mejoras en la tecnología para conseguir que el desarrollo embrionario *in vitro* se efectúe con la misma facilidad que en el oviducto, y que permitan la costeabilidad y expansión de estas técnicas en la práctica ganadera, como hasta ahora lo ha sido la IA.
- g) El tiempo entre colección de ovarios e incubación de ovocitos, puede influir significativamente en los índices de desarrollo embrionario. Por esto, se precisa la reducción de este factor, así como el estricto control térmico tanto en el manejo de los ovarios como de los gametos obtenidos durante todo el proceso.

- h)** Una meta de cualquier empresa ganadera, es el incremento en la productividad por lo cual se precisa la aplicación de las herramientas que ayuden a lograrla.

- i)** Un factor importante en las estrategias para el mejoramiento animal, es la recuperación de ovocitos de animales vivos combinada con la FIV. Así, se incrementa la posibilidad de balancear la calidad de los embriones creados *in vitro* con los costos de producción.

- j)** La FIV como una biotecnología en busca de mejora continua tiene el propósito de aumentar las tasas de embriones producidos *in vitro* y se ha buscado la optimización de los medios de cultivo, lo que ha conducido a la simplificación de los mismos, al eliminar los componentes innecesarios o incluso perjudiciales (Mejía *et al.*, 2009).

8. REFERENCIAS

1. Adamiak, K.; Mackie, R.; Webb, K.; Sinclair, D. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology Reproduction*; 73 (5): 918-926.
2. Ahuja, C.; Montiel, F.; Hernández, P.; Gallego, J. 2009. Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*. 3(27):281; [consultado 2016 Dic 07].
<http://www.scielo.org.ve/pdf/zt/v27n3/art07.pdf>.
3. Alvarez, J. 2005. Preparación del semen para técnicas de reproducción asistida. Centro de Infertilidad Masculina ANDROGEN, La Coruña. Harvard Medical School, Boston.
4. Austin, R. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian J. Sci. Res. Ser. B*, 4:581.
5. Báez, J.; Adeymi, C.; Hernández, H.; Villamediana, P. 2010. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus* *Revista Científica, FCV-LUZ* Vol. XX, No 3, 259 - 267.
6. Baldassarre, H. 2005. Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Revista Brasileira Reproducción Animal*. Belo Horizonte, v.31, n.2, p.274-282.

7. Bavister, B. 2002. Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*. 2002. 124(2):181-96.
8. Bearden, H.; Fuquay, J. 1997. *Applied Animal Reproduction*. 4th. Edition. A Simon & Schuster Company. Upper Saddle River, NJ. p. 351.
9. Bermejo, P. Lonergan, P. Rizos, D. Gutiérrez, A. 2010. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 20(3), 341-349.
10. Bernal, S. Gonella, A. Valbuena, D. Mendoza, R. Molina, J. Chacón, L. 2011. Effect of age and coasting period on oocytes quality and their *in vitro* development from prepubertal cattle. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2),2499-2506.
11. Bowen, R. 1977. Fertilization *in vitro* of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens *Biology of Reproduction* 17:144–147.
12. Brackett, G.; Bousquet, Mt.; Boice, J.; Donawick, F.; Evans, A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27: 147-158.
13. Block, J. Hansen, P. Loureiro, B. Bonilla, L. 2011. Improving post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, 76 (9), 1602-1609.

14. Caicedo, L.; Toro, M. 2016. Comparación de los protocolos SOF y TALP de Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. p 13.
15. Chang, MC. 1968. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. Nature, 184, 406.
16. CONtexto Ganadero. 24 de Octubre 2014. Técnica *in vitro*: la forma más rápida de mejorar la genética bovina. [consultado 20 Dic 2016]. Disponible en:
<http://www.contextoganadero.com/internacional/tecnica-vitro-la-forma-mas-rapida-de-mejorar-la-genetica-bovina>
17. CONtexto Ganadero. 14 de Julio de 2016. GANADERÍA SOSTENIBLE: ¿Cuánto vale producir un embrión bovino?. [consultado 08 de Nov 2017]. Disponible en:
<http://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/cuanto-vale-producir-un-embrion-bovino>
18. Dale, B.; Elder, K. 1997. *In vitro* fertilization. Cambridge University Press. p. 187.
19. De los Reyes, M. 1994. Fecundación *in vitro* en bovinos: Avances en el manejo de gametos. Avances de Medicina Veterinaria, Vol.9, N°1.
20. Dhali, A.; Anchamparuthy, M.; Butler, P.; Pearson, E.; Gwazdauskas, C. 2009. *In vitro* development of bovine embryos cultured with stem cell factor or insulin-like growth factor-I

following IVF with semen of two bulls having different field fertility. *Animal Reproduction Sci.* 116(3–4):188–195.

21. Diez, C.; Muñoz, M.; Caamaño, J.; Gómez, E. 2010. Biotecnologías Reproductivas: Producción y criopreservación de embriones *in vitro*. Tecnología agroalimentaria. [con acceso 2017, enero 10]. URL: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4578>.
22. El-Sherry, M.; Elsayed, M.; Abdelhafez, K.; Abdelgawad, M. 2014. Characterization of rheotaxis of bull sperm using microfluidics. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro*; 6:1111e21.
23. Even, M.; Sandusky, C.; Barnard, N. 2006. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol.* 24:105-8.
24. FAO. 2010. Situación de la biodiversidad en el sector ganadero. Amenazas a la diversidad genética del ganado. www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s06.pdf.
25. FEDEGAN. Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2015- 2019. Bogotá Mayo de 2015.
26. Felmer, R. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: Suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. Med. Vet.* 38(2): pp.97-104.

27. Fernández, A.; Díaz, T.; Muñoz, G. 2007. Producción *in vitro* de embriones bovinos. Rev. Fac. Cs. Vet. 48(1):51-60.
28. Fernández, A; Bastidas, P; Trocóniz, J. 1997. Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 5(Supl. 1): 324-325.
29. Ferreira, E. Vireque, A. Adona, P. Meirelles, F. Ferriani, R. 2010. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence [fe de erratas en Theriogenology, 73(8),1164]. Theriogenology. 2009, 71(5), 836-848.
30. Foo, J. 2010. Modelling of energy expended by free swimming spermatozoa in temperature-dependent viscous semen. J Med Eng Technol; 34:78e84.
31. García, J.; Martínez, L. 2013. Implementación de un protocolo de Fertilización *in vitro* en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano [Tesis]: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano - Honduras.
32. Garde, J.; López, L.; Gallego, M. [con acceso 2017, enero 8]. Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal. Web en línea. Disponible en: URL: <http://books?id=DzRV7xD5QC&pg=PA84&dq=obtencionde+ovocitos+bovinos&hl=es&ei=>

zvmMTbu7IIGatwfmkGcDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resum=5&ved=0CDwQ6AEwBA#v=onepage&q&f=false

33. Gadelha, H.; Gaffney, E.; Smith, D.; Kirkman-Brown, J. 2010. Nonlinear instability in flagellar dynamics: a novel modulation mechanism in sperm migration? *J R Soc Interface/R Soc*; 7:1689e97.
34. Gómez, N.; López, A.; Ortiz, L.; Ruiz, Z.; Olivera, M.; Tarazona, A. 2013. Effect of conjugated linoleic acid on sex ratio and quality of *in vitro* produced bovine embryos. Grupo de investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Antioquia, Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Antioquia, Antioquia, Colombia. DPA/FCA Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
35. Gonella, D.; Atuesta, E.; Bernal, M.; Chacón, L. 2013. Generalidades de la producción de embriones bovinos *in vitro*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 4(1):65–80.
<http://search.proquest.com/docview/1470877485?pq-origsite=gscholar>
36. Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB International, Wallingford, UK. pp 102.
37. Guimarães, P. 2012. Genética Básica para Veterinaria. 3a Edición. São Paulo: Roca.

- 38.** Guzmán, A.; Barrera, C.; Gómez, A.; Patiño, M.; Preciado, J.; Gómez, J. 2008. Transferencia de embriones: conceptos básicos y aplicaciones actuales, presentación curso Reproducción Animal Avanzada, UNAD, Colombia.
- 39.** Hernández, H. Fecundación *in vitro*. [Web en línea]. [2004] [con acceso el 2017 febrero 20]; [5pag]. Disponible en: [URL:http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online-manual-ganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf](http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf)
- 40.** Hernández, H. 2001. Fertilización *in vitro*. En: Reproducción bovina. Gonzáles Stagnaro (Ed). Fundación Girardz. Maracaibo, Venezuela. Cap. XXVI: 411 – 426.
- 41.** Herradón, P.; Quintela, L.; Becerra, J.; Ruibal, S.; Fernández, M. 2007. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. [Con acceso 2017, enero 12]. URL: <http://www.alpa.org.ve/PDF/arch%2015%20supl/pherradon.pdf>
- 42.** Hincapié, J. 2010. Memoria técnica curso de graduación. Preparación de las columnas de percoll. Honduras.
- 43.** Hyakutake T, et al. J Biomech. 2015. Effect of non-Newtonian fluid properties on bovine sperm motility. Faculty of Engineering, Yokohama National University, 79-5 Hodogaya, Yokohama 240-8501, Japan. Electronic address: hyaku@ynu.ac.jp.

44. Hu, X. Ji, S. Li, Y. Fan, C. Cai, H. 2010. Acrosome formation-associated factor is involved in fertilization. *Fertility and Sterility*, 93(5),1482-1492.
45. Hunter, R.; Coy, P.; Gadea, J.; Rath, D. 2011. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilization. *J Assist Reprod Genet*; 28:191e7.
46. INTA. 2010. Memoria técnica curso de graduación: Producción *in vitro* y criopreservación de embriones bovinos. Argentina, Balcarce: Junio, pp. 1-85.
47. INTA. 2004. Aplicación de la producción *in vitro* de embriones en producción animal. [Web en línea]. [con acceso el 2017 enero 10]; [4pag]. Disponible en: URL: <http://www.inta.gov.ar/expo/intaexpone/intaexpone04/charlas/saubidet/embrio.pdf>
48. Ishimoto, K.; Gaffney, E. 2015. Fluid flow and sperm guidance: a simulation study of hydrodynamic sperm rheotaxis. *J R Soc Interface/R Soc* 12.
49. Leivas, F. Brum, D. Fialho, S. Saliba, W. Alvim, M. 2011. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology*, 75(3), 429–433.
50. Lambert, R.; Bernard, C.; Rioux, I.; Beland, R.; D'amours, U.; Montreuil, A. 1983. Endoscopy in cattle by the paraloumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology* 20: 149-161.

- 51.** Mahi, C., Yanagimachi, R. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology* 196:189–196.
- 52.** Mamo, S. Carter, F. Lonergan, P. Leal, C. Al Naib, A. 2011. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics*, 12, 151.
- 53.** Martínez, O. Antillón, J. Rodríguez, F. 2016. Fertilization rate, development and quality of Holstein bovine embryos produced *in vitro* with sexed semen and addition of IGF-I. *TECNOCENCIA Chihuahua* 9(3): 140-147.
- 54.** Mejía, V.; Arango, S.; Pareja, A.; Camargo, O.; Urrego, R. 2009. Evaluación de dos medios de cultivos sobre la producción *in vitro* de embriones bovino. *Revista CES de Medicina Veterinaria Zootecnia* 4(2): 39-46
- 55.** Meza, V., Trejo, A., Magaña, H., Sandoval, C., Chay, A., Cavazos, A. & Martínez, C. 2014. Perfil metabólico de isómeros de Ácido Linoleico Conjugado y calidad de ovocitos en ovejas de pelo. *Nova scientia*, 6(12), 287-303.
- 56.** Mucci, N.; Aller, J.; Cabodevila, J.; Káiser, J.; Hozbor, F.; Alberio, R. 2006. Producción *in vitro* y criopreservación de embriones bovinos: 2010 p. 1-10. *Arch. Med. Vet.* 38(2): pp.97-104.

57. Mucci, N. 2010. Memoria técnica curso de graduación: criopreservación de embriones bovinos, aspectos criobiológicos y técnicos. Balcarce, Buenos Aires.
58. Mucci, N. 2010. Memoria técnica curso de graduación: PIV de embriones bovinos aspectos técnicos y biológicos. Balcarce, Buenos Aires.
59. Orzuna, G. 2015. Producción *in vitro* de embriones de bovino. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Ciencia Animal. p20 – 80.
60. Páez, E. 2013. Módulo reproducción animal avanzada. Unidad 3. Últimas biotecnologías reproductivas aplicadas a la producción animal. Capítulo 1. Fertilización *in vitro*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. CEAD Tunja.
61. Peláez, V. 2011. Producción *in vitro* de embriones bovinos. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ecuador.
62. Plan estratégico de la ganadería colombiana. PEGA 2019. Federación colombiana de ganaderos FEDEGAN.
63. Pontes, J. Melo, F. Basso, A. Ferreira, C. Sanches, B. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a largescale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 75(9), 1640–1646.

64. Rätty, M. Ketoja, E. Pitkänen, T. Ahola, V. Kananen, K. 2011. *In vitro* maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. *Cryobiology*, 63(3), 245-255.
65. Rivera, M. 2013. Manual de biotecnología reproductiva en bovinos. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Del Tolima. Colombia.
66. Robledo, J.; Herrera, J.; Cajero, M.; Navarro, M.; García, V. 2009. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 95 – 99.
67. Ruíz, J.; Correa, J.; Martínez, M. 2010. Vitrificación de ovocitos bovinos y su uso en el desarrollo partenogénico de embriones. *Arch Med Vet* 42: 79-83.
68. Rodriguez, H. 2012. Assisted Reproductive Techniques for Cattle Breeding in Developing Countries: A Critical Appraisal of Their Value and Limitations. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 Suppl(1), 21-26.
69. Ruíz, L. 2010. [con acceso 2016, agosto 26]. Ovum Pick-Up en bovinos: Aplicaciones en biotecnología de la reproducción. [Web en línea]. Disponible en: URL: <http://es.scribd.com/doc/32729927/cys-31-58-63-OVUM-PICK-UP-OPU-en-bovinos-Aplicaciones-en-Biotecnologi%CC%81a-de-la-reproduccio%CC%81n>

70. Salazar, H. 2005. Evaluación reproductiva de las hembras bovinas sacrificadas en el matadero de la Ciudad de Popayán en el segundo semestre del 2005. Recuperado de <https://plusformacion.us/Recursos/r/Evaluacion-reproductiva-hembras-bovinas-sacrificadas#bibliograa>
71. Serizier, A. 2011. Fecundación *in vitro*. [con acceso 2017, febrero 01] [web en línea]. Disponible en: URL http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo4-s8.pdf
72. Smith, D.; Niemann, H. 1999. Biotechnology in genetics and reproduction. *Livestock Production Science*, 59: 207-221.
73. Sreenan, J. 1970. *In vitro* maturation and alternated fertilization of cattle follicular oocytes. *J. Agric. Sci. Camb.* 75: 393-396.
74. Sánchez, M. 2014. Comparación de dos medios de cultivo *in vitro*: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano [Tesis]: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano- Honduras. 33 p.
75. Solís, R.; Chávez, P. 2015. Evaluación de producción *in vitro* de embriones en cuyes (*cavia porcellus*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la universidad técnica de Cotopaxi. Ecuador.

76. Thibault ,C., Dautier, L. 1961. Analyse des conditions de la fecondation *in vitro* de l'oeuf de la lapine *Annees de la Biologie Animale et de Biochimie et Biophysique*. 1:277–294.
77. Urrego, R.; Tarazona, A.; Olivera, M.; Camargo, O. 2008. Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev Colom Ciencias Pecuarias*. 21(3):398–405; [consultado 2017 Abr 01].
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-06902008000300009.
78. Vázquez, J. 2010. Horizontes en biotecnología de la reproducción animal. Discurso de ingreso. Academia de Ciencias de la Región de Murcia, España: 1-94.
79. Watanabe, M.; Lobo, R.; Franceschini, P.; Dayan, A.; Vila, R.; Galerani, M.; Watanabe, Y. 1998. Producao *In vitro* de embrioes por sessao de aspiracao en femeas nelore. *Arquivo Faculdade de Veterinaria UFGRS*. V.26 número 1 p. 382- 383.
80. Zarate, O. 2006 Tesis: comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos; Veracruz: p.6.