

Criterios de clasificación morfológica de ovocitos bovinos provenientes de la planta de beneficio
de García Rovira

Jody Paola Castillo Rojas

Trabajo de Grado para Optar al Título de zootecnista

Director

Daniel Felipe Torres Ruda

MSc, Zootecnista

Codirector

Henry Alberto Grajales Lombana

PhD. MSc. Zootecnista

Universidad Industrial de Santander

Instituto de Proyección Regional y educativo a Distancia IPRED.

Programa Académico Zootecnia.

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

Agradezco a Dios por iluminar y guiar mi camino, permitiéndome alcanzar uno de mis sueños más anhelados y culminar una de las metas más importantes en mi formación profesional.

Quiero dedicar este logro a mis padres, María Rojas y Over Castillo, por su inmensa dedicación, amor sincero y el sacrificio que hicieron. Gracias a ellos, pude completar este trayecto universitario, recibiendo valiosos valores, enseñanzas y consejos a lo largo de mi vida.

También quiero expresar mi gratitud a mi hermano, Anderson Castillo, por su apoyo incondicional y por todos los preciosos momentos que hemos compartido.

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a Dios por brindarme la sabiduría, la fortaleza y la guía necesarias para culminar este proceso de aprendizaje, superando obstáculos y avanzando hacia mi meta.

Quiero extender mi reconocimiento al director de tesis, MsC. Daniel Felipe Torres Ruda, quien desde el principio confió en mí y respaldó el desarrollo de la propuesta de trabajo de grado. Su apoyo fue fundamental en cada etapa, desde el trabajo de campo hasta la redacción del documento final. Agradezco su tiempo, paciencia, constante disposición y dedicación para asegurar el éxito de este proyecto, compartiendo su valioso conocimiento, afecto y confianza.

A mis padres y a mi hermano, les agradezco su apoyo incondicional, así como el amor y el interés que demostraron en todo momento.

Agradezco también a mis compañeras de alegrías y tristezas, Gina Cely y Angelica Rodríguez, quienes estuvieron a mi lado de manera incondicional durante todo este proceso, brindándome consejos y nunca permitiéndome flaquear en la consecución de esta importante meta en mi vida.

Asimismo, agradezco al laboratorio de reproducción y biología de la Universidad Industrial de Santander por brindarme acceso a sus equipos y materiales, permitiendo la ejecución de los datos necesarios para mi trabajo de grado.

Finalmente, mi reconocimiento a la Universidad Industrial de Santander, su equipo de recursos humanos y, en particular, a los docentes que, a lo largo de nuestra formación profesional, nos brindaron su apoyo y compartieron su valioso conocimiento.

Tabla de Contenido

1	Objetivos	16
1.1	Objetivo General	16
1.2	Objetivos Específicos	16
2	Marco teórico	17
2.1	Biología reproductiva	17
2.1.1	Historia	18
2.1.2	Procesos de biología	22
2.1.3	Técnicas empleadas en la biología reproductiva	23
2.1.4	Tipos de biología reproductiva	24
2.1.4.1	Quimeras.	24
2.1.4.2	Semen Sexado.	25
2.1.4.3	Clonación	27
2.1.4.4	Fertilización in vitro (FIV)	28
2.1.4.5	Criopreservación	29
2.1.4.6	Vitrificación	31
2.2	Biologías asociadas al manejo de la hembra	31
2.2.1	Transferencia de embriones	31
2.2.2	Técnica MOET	33
2.2.3	Colecta y manejo de ovarios	34
2.2.4	Transporte de ovarios	34
2.2.5	Clasificación de folículos	35
2.2.6	Ovum pick-up (OPU)	37
2.2.7	Colecta post mortem	39

CLASIFICACIÓN DE OOCITOS BOVINOS.

5

2.2.8	Utilización de oocitos	40
2.2.9	Clasificación de oocitos	40
2.2.10	Morfología del oocito	42
2.2.11	Morfología del oocito maduro	42
2.2.12	Complejo cúmulus oocito	43
2.2.13	Zona pelúcida	44
2.2.14	Función de la zona pelúcida	44
2.2.15	Características morfológicas de la zona pelúcida	45
3	Metodología	46
3.1	Ubicación	46
3.2	Material Biológico	46
3.3	Procedimiento de laboratorio	46
3.4	Análisis de la imagen	47
3.5	Análisis estadístico	47
4	Resultados y discusión	48
5	Conclusiones	56
6	Recomendaciones	57
	Referencias Bibliográficas	58

Lista de Tablas

Tabla 1. Aplicación de la biotecnología reproductiva	20
Tabla 2. Desarrollo generacional de la biotecnología de la reproducción	21
Tabla 3. La evolución de la biotecnología en los últimos siglos	21
Tabla 4. Evolución técnica – Semen sexado	26
Tabla 5. Programa de TE en el mundo	32
Tabla 6. Variaciones anuales de la tasa de embriones transferidos durante 9 años en 10 países de la Unión Europea	32
Tabla 7. Desarrollo folicular y sus características y modificaciones	36
Tabla 8. Clasificación de las proteínas de la zona pelúcida	45
Tabla 9. Número de folículos encontrados en los ovarios analizados	49
Tabla 10. Medidas morfométricas de oocitos Bovinos	51

Lista de Figuras

Figura 1. Expansión de las células del cumulus	43
Figura 2. Categorización de los oocitos según criterios cualitativos.	52
Figura 3. Mediciones morfométricas de oocitos en micras.	53
Figura 4. Boxplot Distribución del diámetro de la corona radiada	54
Figura 5. Boxplot Distribución del diámetro del antro	55

Glosario

Aspiración folicular: La aspiración folicular es una técnica mediante la cual los ovocitos inmaduros son recolectados de los folículos mediante aspiración por ultrasonografía o aspiración post-mortem (Álvarez et al., 2022).

Antro del oocito: Cavidad formada por el acúmulo de fluido rico en hormonas esteroideas, especialmente estrógenos (Vásquez - Cano & Olivera - A, 2010)

Blastocisto: Los blastocistos son el resultado de una ordenación espacial de las blastómeras del embrión, caracterizándose por presentar un estrato envolvente de células o trofoectodermo (TE)(Mukrimaa et al., 2016).

Biotechnología reproductiva: La biotecnología de la reproducción es un conjunto de técnicas que van desde la inseminación artificial hasta la clonación, todas ellas encaminadas a aumentar la eficiencia reproductiva de los animales (Udalge, 2014).

Cumulus: Grupo de células que rodean al ovocito dentro del folículo ovárico y después de la ovulación, y son responsables del desarrollo de competencia y maduración (Guevara-Chacón et al., 2020).

Fagocitosis: Consiste en la absorción activa de grandes partículas y de células que son sometidas a mecanismos intracelulares de destrucción, lo que determina las propiedades bactericidas de los granulocitos (Empendium; et 2021).

Ferritina: Es una proteína que almacena hierro. Los glóbulos rojos necesitan hierro para formarse con normalidad y transportar oxígeno por todo el cuerpo (Ferritina, n.d.2023)

Heparina: Polisacárido complejo que impide la formación de trombos en los vasos sanguíneos (Heparina | Definición | Diccionario de La Lengua Española | RAE - ASALE, n.d.)

Implantación: Fijación del ovocito fecundado en la mucosa uterina(Diccionario de La Lengua Española 2023 .)

In vitro: Se emplea en referencia a los procedimientos de experimentación científica que se realizan con organismos vivos (Diccionario Panhispánico de Dudas | RAE - ASALE, n.d.).

Inmunoglobulinas: Las inmunoglobulinas (anticuerpos) son proteínas de importancia vital que circulan en el torrente sanguíneo y realizan una amplia variedad de funciones. Influyen

notablemente sobre el equilibrio de nuestro sistema inmunitario. (Inmunoglobulina Bittest, n.d. 2023).

Moet: La técnica de MOET consiste en la estimulación del ovario de la hembra para que produzca un mayor número de óvulos, para luego de ser fertilizada, ya sea natural o artificialmente, recuperar los embriones y transferirlos a hembras receptoras (Rodríguez et al., 2011).

Microscopio: El microscopio es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños como para ser vistos por la vista del ser humano (Ciencias Naturales, 2020).

Ovulema: Membrana celular de las células del linaje gonadal femenino.

Oocitos: Son células ovogonias o células germinales primordiales sufren divisiones mitóticas prenatalmente para asegurar que la hembra nazca con suficientes células germinales que posteriormente formarán folículos y así mismo den origen a oocitos viables. (Tarazona et al., 2010).

Polisperma: La polispermia (entrada de más de un espermatozoide al ovocito) es una condición patológica en mamíferos ya que impide el desarrollo embrionario. (Saavedra Leos, M. D. (2009)

Semen: Fluido espeso y de color blanquecino que está compuesto por un líquido en el que se encuentran en suspensión los espermatozoides; se produce por las secreciones de distintas glándulas del aparato reproductor de los machos (RAMOS, 2017).

Trabecular: Estructura alargada que, frecuentemente unida o entrecruzada con otras, sirve de soporte a un órgano o atraviesa una cavidad (Real academia española 2022)

Xenobiótica: Dicho de una sustancia química: Que es ajena a los organismos de un ecosistema (Diccionario de La Lengua Española 2023)

Zona pelúcida: (ZP) es una matriz glicoprotéica extracelular que rodea al ovocito y se mantiene durante todo el desarrollo embrionario hasta la implantación en el endometrio (Mukrimaa et al., 2016).

Resumen

Título: Criterios de clasificación morfológica de ovocitos bovinos provenientes de la planta de beneficio de García Rovira *

Autor: Jody Paola Castillo Rojas^{1**}

Palabras Clave: Folículos, Oocitos, Antro, Cumulus

Descripción: El presente trabajo tiene como objetivo establecer una escala de clasificación para oocitos obtenidos de planta de beneficio, utilizando un criterio cuantitativo basado en mediciones realizadas en condiciones de laboratorio. Se recolectaron 246 ovarios de vacas mestizas de la planta de beneficio en Málaga, Santander, con el código 315B/362P, de los cuales se extrajeron 169 oocitos. Estos fueron obtenidos de 2682 folículos de vacas no gestantes, de los cuales 2228 tenían un diámetro menor a 4 mm, 335 estaban en el rango de 4 a 8 mm y 119 superaban los 8 mm. De los cuales los oocitos se clasificaron en 4 tipos A,B,C y D, de lo cual la clasificación tipo A: se presentaron buena integridad y se presentaban de manera compacta, la clasificación B: los oocitos con una corona radiada más dispersa, la clasificación C: la corona radiada no se presenta en algunas zonas del oocito, además de esto el antro presenta un menor tamaño a los oocitos que se presentan en la clasificación tipo A. y los oocitos que no presentan corona radiada se denominaron dentro de la clasificación D. Para las diferentes características se llevaron a cabo mediciones morfométricas en los mismos, de los cuales, se determinó lo siguiente, diámetro del antro, la longitud de la zona pelúcida, el área del antro, el área de las células del cumulus y la longitud de las células del cumulus.

* Criterios de clasificación morfológica de ovocitos bovinos provenientes de la planta de beneficio de García Rovira

**Instituto Proyección Regional y Educación a Distancia IPRED. Programa de zootecnia.
Director: Daniel Felipe Torres Ruda. Zootecnista MsC.

Abstract

Title: Morphological classification criteria of bovine oocytes from the Garcia Rovira processing plant.^{2*}

Author(s): Jody Paola Castillo Rojas.³

Key Words: Follicles, Oocytes, Antrum, Cumulus

Description: The objective of the present work is to establish a classification scale for oocytes obtained from the mill, using a quantitative criterion based on measurements made under laboratory conditions. A total of 246 ovaries were collected from crossbred cows from the processing plant in Malaga, Santander, with code 315B/362P, from which 169 oocytes were extracted. These were obtained from 2682 follicles of non-pregnant cows, of which 2228 had a diameter of less than 4 mm, 335 were in the range of 4 to 8 mm and 119 were larger than 8 mm. Of which the oocytes were classified into 4 types A, B, C and D, of which the type A classification: they presented good integrity and were presented in a compact manner, the B classification: oocytes with a more dispersed corona radiata, the C classification: the corona radiata is not present in some areas of the oocyte, in addition to this the antrum presents a smaller size than the oocytes that are presented in the type A classification. For the different characteristics, morphometric measurements were carried out on the oocytes, of which the following were determined: diameter of the antrum, length of the zona pellucida, area of the antrum, area of the cumulus cells and length of the cumulus cells.

^{2*} Morphological classification criteria of bovine oocytes from the Garcia Rovira processing plant

³Regional Projection and Distance Education Institute IPRED. Animal Husbandry Program. Director: Daniel Felipe Torres Ruda. Zootechnician MSc.

Introducción

El ganado bovino es considerado el pilar fundamental de las producciones en todo el planeta como lo menciona Carazas, (2018). Sin embargo, el aumento de la población mundial ha exigido un incremento de las exportaciones tanto agrícolas como pecuarias según el Instituto Agropecuario ICA (2019). Entre los tipos de ganado, el de ceba destaca por su calidad y es exportado principalmente a países como Arabia Saudita, Emiratos Árabes Unidos, Egipto, Jordania, Líbano, Libia, Hong Kong y Vietnam. En 2019, las exportaciones alcanzaron 5532 toneladas, según reportes del DANE (2019).

García Rovira se destaca en la producción pecuaria, aprovechando la diversidad de pisos térmicos y la adaptabilidad de los animales a distintas zonas geográficas según informes de la Cámara de Comercio Bucaramanga (2018). La región cuenta con 116,286 hectáreas destinadas a la producción pecuaria con una distribución en especies que incluye 62% de bovinos, 18.5% de caprinos, 12.2% de ovinos, 4.0% de porcinos, 3.3% de equinos y 0.05% de bufalinos (Bucaramanga, 2018).

El incremento en la demanda de alimentos de origen animal se debe al rápido crecimiento poblacional lo que ha impulsado el desarrollo de métodos e investigaciones innovadoras en producción (Ali, 2021). Estos avances han permitido mejoras genéticas en especies de interés productivo, aumentando gradualmente la producción. La biotecnología aplicada a cría, reproducción y genética molecular ha contribuido significativamente al progreso de la producción pecuaria, fomentando el intercambio de recursos genéticos entre países y la mejora continua de la especie (Ali, 2021).

Debido a lo anterior, se ha venido implementando la investigación de estrategias innovadoras, desarrollando métodos que aceleren paulatinamente la producción a través de mejoras genéticas de diferentes especies de interés (Ali, 2021). Se menciona que la biotecnología de cría, la reproducción y la genética molecular ha contribuido con la producción pecuaria en los países más avanzados y gracias a esto, se ha alcanzado el desarrollo de individuos con mejores rendimientos, generando un intercambio de recursos genéticos de diferentes países para perpetuar la especie y hacer mejoras en estas.

Colombia, con su diversidad geográfica, destaca en la producción pecuaria siendo la ganadería uno de los sectores más influyentes. Aporta al país cerca de 7.393 millones de litros de leche y 888.000 toneladas de carne, según el Economista Colombia (n.d. 2022). Para el 2022, el inventario ganadero alcanzó los 29.6 millones de bovinos consolidando al país como una potencia en el sector ganadero de América Latina, según datos del ICA (2022).

El Instituto Nacional Agropecuario presentó durante su censo agropecuario de 2022 información acerca de diferentes especies de interés productivo; la población bovina se encuentra distribuida por el país en 633.841 predios y totaliza 29.301.392 animales, presentándose un incremento en la producción bovina en un 4,7% con respecto al 2021 a nivel nacional en la zona de Amazonas, Vaupés, Guainía donde la producción de bovinos es mayor a 3'000.000 (ICA, 2022).

En García Rovira, la producción ganadera se caracteriza por la alta calidad genética y fenotípica de la raza normanda, adaptada a las condiciones climáticas y topográficas de la región. Aunque se ha trabajado en la mejora genética de esta raza mediante monta natural e implementación de genética en pie, ello ha implicado un aumento en los costos de transporte y alimentación de animales de alta genética.

La producción bovina está influenciada por los índices de producción de carne fresca o refrigerada y el crecimiento poblacional a nivel mundial según la FAO (FAOSTAT, 2023), donde la producción de carne bovina fresca o refrigerada en Colombia alcanzó su punto máximo en 2015 con aproximadamente 854.314 toneladas. Sin embargo, para 2021, el reporte indica solo 743.901 toneladas.

A la fecha, no se evidencian registros que admiten dar cuenta del desarrollo de programas para la conservación genética, así como, la viabilidad en la implementación de nuevos planes que permitan procesos de biotecnología reproductiva, y de los cuales se proyectan estudios para la extracción, análisis y conservación de ovocitos como parte del material genético de la Provincia García Rovira, aun cuando cuentan con buen material genético con la raza Normando esto debido a su adaptabilidad y al desarrollo productivo superior frente a diversas razas. Por ello en esta investigación se plantea la siguiente pregunta ¿Es viable la creación de un criterio de clasificación cuantitativo para determinar la morfología y la viabilidad de los oocitos? Esto surge de la necesidad de evaluar la calidad de oocitos mediante medidas, dado que los sistemas de evaluación morfológica actuales son subjetivos. El objetivo es redefinir la caracterización morfológica de los oocitos para obtener una producción in-vivo más efectiva.

El presente estudio ha propuesto evaluar y generar un valor cuantitativo de la estructura de morfométrica de los oocitos y con ello consolidar una nueva clasificación que se pueda utilizar en futuros proyectos de biotecnología reproductiva, esto teniendo como referencia uno de los estudios más importantes en esta área de reproducción: la clasificación morfometría de las células germinales y sobre la cual, se han desarrollado en otros países categorías cualitativas para determinar su viabilidad. Para esto se plantea evaluar la clasificación mediante medidas morfológicas de ovocitos bovinos mestizos de la provincia de García Rovira, en la planta de

beneficio registrada ante el Invima con código 315B/362P. La clasificación morfológica mediante medidas permitirá que no sea subjetiva, dado que también se debe tener en cuenta el estado de maduración en que se encuentren, ya sean primarios, secundarios o terciarios y poder determinar si son viables o aptos para una fecundación in vivo

1 Objetivos

1.1 Objetivo General

Consolidar una escala para la clasificación de oocitos obtenidos en planta de beneficio mediante un criterio cuantitativo acorde a las mediciones realizadas bajo condiciones de laboratorio.

1.2 Objetivos Específicos

Evaluar la capacidad de recolección de oocitos acorde a su ubicación anatómica y el tamaño folicular de ovarios obtenidos en planta de beneficio y la técnica de extracción.

Determinar la similitud entre categorías cualitativas y mediciones in vivo sobre la morfometría de oocitos obtenidos en planta de beneficio.

2 Marco teórico

2.1 Biotecnología reproductiva

La biotecnología reproductiva representa una tecnología innovadora que aún guarda numerosos secretos por descubrir y aplicar. Es crucial tener en cuenta que esta innovación conlleva considerables riesgos, ya que requiere inversiones económicas sustanciales. Estas inversiones solo se materializarán si se aplica de manera adecuada en el ámbito de investigación pertinente (Rodríguez et al., 2011). Es importante reconocer que las inversiones dirigidas a la investigación no siempre generan los resultados deseados. Sin embargo, gracias a la disposición a asumir riesgos, se ha observado una mejora en la producción y en la genética animal. Esto se traduce en un rendimiento notablemente superior de los animales y en un aumento en las ganancias económicas para los criadores, particularmente en lo que respecta a la producción de carne, lana y leche (Rodríguez et al., 2011).

Según Rodríguez et al. (2011), las técnicas utilizadas en la reproducción animal tienen como objetivo acelerar el progreso genético al combinar genes de la misma especie. Esto resulta en una mejora de características específicas que se desean obtener en los animales.

Se debe tener en cuenta que las inversiones sometidas a la investigación no siempre dan el resultado que se desea, pero gracias al riesgo que se toma se puede hablar de mejoramiento en las producciones animales y en la genética animal, incrementando el desempeño de las especies y aumentando ganancias económicas para los hatos, por su alta productividad en menores tiempos, como lo son la carne, lana y la leche, de los cuales se obtienen mejores resultados. Además, se menciona que las técnicas aplicadas a la reproducción animal tienen como objetivo contribuir con la aceleración de un posible progreso genético gracias a la combinación de genes de una misma

especie, que darán como resultado un mejoramiento a algún carácter que se desee obtener de parte del animal. (Rodríguez et al., 2011).

A lo largo del tiempo, el uso de la biotecnología ha permitido crear individuos mejorados con las características deseadas, lo que ha llevado a una mejora en la producción. Esto se ha logrado a través de la manipulación genética de individuos con el fin de transmitir mejoras en su potencial productivo a su descendencia. Estos avances genéticos son el resultado de la manipulación realizada en la reproducción de animales de la misma especie (Rodríguez et al., 2011).

2.1.1 Historia

La evolución de la reproducción animal tuvo un punto de inflexión en el siglo XX, después de la Segunda Guerra Mundial. Se reconoce como un beneficio significativo para mejorar los procesos de producción de especies. Es importante destacar que esto se fundamenta en una serie de cambios sucesivos que han ocurrido a lo largo del tiempo en estas especies. La intervención humana ha sido la fuerza impulsora detrás de la evolución de los procesos reproductivos tanto en animales como en plantas (Carazas, 2018).

La biotecnología de la reproducción abarca una gama de técnicas que van desde la inseminación artificial hasta la clonación, según señalan Udalge (2014), Palma, G.A; Gottfried (1997), y Yáñez-Ortiz et al. (2022). Estas técnicas han desempeñado un papel crucial en la evolución y mejora de la genética animal, lo que ha llevado a un aumento en los índices de eficiencia reproductiva y a mejoras en los rasgos genéticos que influyen en el rendimiento de los animales (Palma, G.A; Gottfried, 1997).

Gracias a la intervención del ser humano en la biotecnología ha evitado la extinción de especies y ha facilitado la conservación, como lo indica AGROPECUARIA et al. (2018). Desde la inseminación artificial (IA) hasta técnicas avanzadas como la inyección intracitoplasmática de

células somáticas (ICSI), aspiración folicular, fertilización in vitro y criopreservación de gametos, e incluso llegando a la clonación, estas técnicas han sido fundamentales para la preservación de especies en peligro de extinción en su entorno natural.

A medida que ha avanzado el tiempo, como señalan Palma, G.A; Gottfried (1997), se ha observado una disminución en la diversidad y existencia de especies, afectando no solo a la zootecnia sino también a la fauna y flora silvestres. Esto se debe a la caza indiscriminada en el caso de la fauna silvestre y a los avances en genética y producción de proteínas de origen animal. La extinción de razas se produce debido a la producción limitada, lo que va en contra de la rentabilidad económica de su cría.

El crecimiento y el gran desarrollo que ha tenido la tecnología en torno a la investigación de la reproducción animal durante las últimas décadas, ha representado grandes avances para la humanidad pero con una margen de desafío, así mismo se debe tener en cuenta que la evolución de la reproducción lleva a tener costos adicionales; pero su vez se vinculan los costos en relación al beneficio que conlleva, lo que se llamaría costo/beneficio (facultad de medicina veterinaria y agropecuaria et al., 2018).

Udalge, (2014) menciona que el rápido avance tecnológico y global no es del todo favorable para países en desarrollo, como la mayoría de los países iberoamericanos que se encuentran en ese proceso. Sin embargo, se debe tener en cuenta que dicho desarrollo es proporcional a los recursos destinados a la investigación científica, así como a los recursos humanos y aunque cada vez más se destinan a recursos de tecnología, es importante que esta sea asequible para la comunidad independientemente de su nivel socio- económicos, ya que si se limita el acceso a estos recursos tecnológicos de innovación, se está limitando a gran parte de la población de un lugar determinado como lo menciona Udalge, (2014).

En los últimos años, se han logrado avances significativos en diversas tecnologías e investigaciones a nivel mundial. El uso de la genética poblacional y la genética estadística ha permitido la implementación de programas de selección genotípica y fenotípica en diferentes especies de interés zootécnico (Palma, G.A; Gottfried, 1997).

En la actualidad se observa una disminución en la disponibilidad de recursos genéticos en poblaciones de especies domésticas debido al ritmo de explotación al que están sometidas. Esto ha llevado a que algunas razas estén en peligro de extinción o incluso se hayan extinguido, ya que no son viables para las explotaciones deseadas (Udalge, 2014). Es importante señalar que la biotecnología reproductiva se diferencia de las técnicas genéticas, ya que no altera el genoma de los animales.

Tabla 1

Aplicación de la biotecnología reproductiva

Tipo de técnica	Características.
Inseminación artificial y congelación de semen	<ul style="list-style-type: none"> - Eliminación y disminución de enfermedades sexuales - Uso intensivo de un macho de alto valor genético. -Aumento de la eficiencia de la estimación del valor genético (test de progenie)
Sincronización e inducción de la ovulación	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento de la eficiencia de la producción de terneros - Aumento de la eficiencia del manejo productivo y reproductivo
Superovulación, transferencia y congelación de embriones	<ul style="list-style-type: none"> -Uso intensivo de la hembra de alto valor genético - Recuperación más eficaz de individuos exóticos y razas en peligro de extinción - Formación de bancos de germoplasma - Importación y exportación de material genético
Micromanipulación de embriones para producir mellizos homocigotas y quimeras	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento del número de animales nacidos por embrión - Aumento de la eficiencia del valor genético - Creación de modelos óptimos de experimentación
Determinación y selección del sexo de embriones y espermatozoides	<ul style="list-style-type: none"> -Producción de la descendencia con el sexo seleccionado

Tipo de técnica	Características.
Producción in vitro de embriones	-Uso de hembras que no responden a tratamientos superovulatorios - Producción de embriones con ovarios de matadero - Uso experimental
Clonado de animales por medio de transferencia nuclear	-Eliminación de la variabilidad de genotipos individuales -Biotecnología de la reproducción 3 - Aumento de la eficiencia de la transgénesis

Nota. Tomado de Palma, G.A; Gottfried (1997)

Tabla 2

Desarrollo generacional de la biotecnología de la reproducción, modificado de Thibier (1990)

Generación	Año	Descripción
Primera	1908	
Segunda	1970	Control hormonal de la ovulación. Transferencia de embriones congelados, división de 540.000 embriones/año.
Tercera	1980	Sexado de embriones y espermatozoides (300.000 terneros nacidos). Producción in-vitro de embriones (106.000/año).
Cuarta	1990	
Quinta	2000	Transgénesis, gene Farming, células madre.

Nota. Tomado de Thibier (1990)

Tabla 3

La evolución de la biotecnología en los últimos siglos

Año	Descripción
1919	El agrónomo húngaro Karl Ereky establece una definición de biotecnología.
1928	El bacteriólogo escocés Alexander Fleming descubre el uso antibiótico de la penicilina.
1943	El científico canadiense Oswald Theodore Avery descubre que el ADN es el portador de los genes.
1953	Los biólogos James Watson y Francis Crick describen la doble hélice del ADN.
1969	Una enzima es sintetizada in vitro por primera vez en la historia.

1983	Se presenta la primera planta (tabaco) genéticamente modificada (transgénico).
1997	Los científicos presentan al mundo a la oveja Dolly, el primer clon de un mamífero.
1998	Se crea un borrador del mapa del genoma humano que ubica más de 30.000 genes.
2010	Un grupo de investigadores del Instituto J. Craig Venter crea la primera célula sintética.
2013	El primer ojo biónico ve la luz en EE.UU, dando esperanza a ciegos de todo el mundo.
2020	Las innovaciones en biotecnología lideran la lucha contra la pandemia provocada por el SARS-CoV-2.

Nota. Tomado de Iberdrola (2020)

2.1.2 Procesos de biotecnología

Las técnicas de biotecnología animal abordan especies como ganado vacuno, caprino, porcino, ovino, aves de corral, peces, animales de compañía y animales silvestres. En tiempos antiguos, no se contaba con un concepto definido de lo que hoy conocemos como biotecnología. Sin embargo, surgió la necesidad de llevar a cabo investigaciones y pruebas para transformar la materia prima en materiales de utilidad, fue el Ingeniero Agrónomo húngaro Karl Ereky quien introdujo el término de biotecnología reproductiva a mediados del siglo XX, marcando así su reconocimiento en esta era caracterizada por el rápido progreso en biología molecular, genética e investigaciones relacionadas con el cultivo celular (Carazas y Ayala, 2018).

La biotecnología reproductiva animal engloba desde la inseminación artificial hasta la clonación. Gracias a los avances científicos y a las investigaciones, se han logrado notables avances en procesos reproductivos, lo que ha contribuido al equilibrio en las producciones. Factores como la fisiología y la alimentación juegan un papel crucial en el desarrollo reproductivo óptimo de los individuos. La integración de la ciencia y el conocimiento en zootecnia desde

mediados del siglo XX ha propiciado un análisis más riguroso y orientado hacia el mejoramiento de razas destinadas a la producción de carne y leche (Carazas, 2018).

La biotecnología tiene como objetivo principal optimizar los recursos genéticos de diversas especies animales, incrementando el número de crías por camada y mejorando las producciones tanto de carne como de leche, difundiendo el germoplasma en diferentes regiones del mundo, como destaca Ferré et al. (2020). De acuerdo con las estadísticas anuales presentadas por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés) en los últimos años, se han transferido más de 400.000 embriones bovinos en todo el mundo, siendo el 80% de estos en estado fresco (Ferré et al., 2020).

2.1.3 Técnicas empleadas en la biotecnología reproductiva

La biotecnología reproductiva ha abordado técnicas y procesos que alcanzan desde la multiovulación y la transferencia de Embriones, enfocadas hacia la estimulación de los ovarios para aumentar la producción de oocitos, y la cual, ha sido ampliamente utilizada en bovinos con el propósito de incrementar el número de animales de pedigrí, acelerando el progreso genético (Rodríguez et al., 2011) preparando a hembras el implante de los embriones y su posterior desarrollo (Rodríguez et al., 2011). Así mismo, el uso de técnicas "in vitro" tales como la fertilización y cultivo de embriones in vitro, la capacitación espermática, recolección y maduración de ovocitos. Esto incluye la obtención de oocitos fértiles, su maduración y fertilización, lo que conduce a la generación de embriones en cultivo "in vitro". Esta técnica surgió debido a la necesidad de producir embriones para investigaciones relacionadas con la transgénesis y la clonación (Rodríguez et al., 2011). El cultivo de embriones "in vitro" se extiende durante aproximadamente 7-9 días antes de que sean transferidos a una receptora o conservados mediante criopreservación (Rodríguez et al., 2011).

Las técnicas de biotecnología han alcanzado niveles hasta manipulación genética, abarcando la clonación, los transgénicos y las quimeras, mediante la producción de clones a partir de células de fetos hembras. Estos procesos se realizan para reproducir animales de gran interés zootécnico, como vacas y toros con un alto potencial genético, cuya descendencia está bien documentada y es viable. Sin embargo, es importante destacar que esta técnica presenta una eficiencia limitada, con solo alrededor del 5% de éxito debido a la complejidad de los mecanismos biológicos involucrados (Rodríguez et al., 2011). En los últimos años se ha desarrollado la tecnología “*Beltville Sperm Sexing Technology*” (Johnson, 1987) la cual se ha implementado para el sexado de semen, y aunque los resultados pueden variar, se puede lograr un porcentaje superior al 90% de crías con sexo predefinido. Esta técnica ha proporcionado beneficios significativos tanto en la cría de ganado como en la producción de leche. Una de las ventajas más destacadas de obtener semen sexado es la capacidad de planificar la reposición de hembras o machos, según las necesidades específicas de la producción de carne o leche (Rodríguez et al., 2011).

2.1.4 *Tipos de biotecnología reproductiva*

2.1.4.1 Quimeras.

Estas quimeras fueron creadas con el propósito de investigar mutaciones o fallos genéticos en individuos. Esto permitió analizar el comportamiento y el desarrollo corporal de dos líneas diferentes de individuos (Rodríguez et al., 2011). Una quimera es el resultado de la combinación de dos embriones con composiciones cromosómicas distintas. Experimentalmente, se logró este proceso en mamíferos, y las quimeras se desarrollaron de manera normal. Sin embargo, es importante destacar que la composición de los cromosomas debe ser la misma, ya sea XX y XX o

XY y XX, para evitar la intersexualidad en el caso de cromosomas diferentes (Rodríguez et al., 2011).

2.1.4.2 Semen Sexado.

Alfonso y Muñoz (2018) describe que el semen sexado fue considerado uno de los avances genéticos más importantes en la historia de la reproducción animal, dado que posibilitó al productor para obtener mejores beneficios en un hato para programar la llegada de hembras o machos, además de esto el mismo autor menciona que en el siglo XX, se realizaron diversos descubrimientos los cuales contribuyeron al campo de la reproducción animal, incluyendo la identificación de los cromosomas sexuales.

A partir de 1980, se comenzó a aplicar la técnica de citometría para determinar el sexo de los individuos en gestación tanto en animales como en humanos. Esta técnica permitió la separación de espermatozoides según sus cromosomas sexuales (Y y X), teniendo en cuenta su contenido de ADN. Se observó que los espermatozoides X contenían más ADN que los Y (Alfonso y Muñoz, 2018; Carazas, 2018; Puerto-Rodríguez, 2019). Además, se deben considerar factores como el estado nutricional, condición corporal, estado reproductivo y sanitario, así como la evaluación del espermatozoide (Puerto-Rodríguez, 2019).

En 1989, se logró el nacimiento de gazapos mediante inseminación intratubárica en conejas. Desde entonces, esta técnica ha permitido la obtención de descendencia de sexo preseleccionado con una precisión del 90% en especies como bovinos, ovinos, porcinos y equinos (Alfonso y Muñoz, 2018). La citometría de flujo, creada en 1992 por el Dr. Lawrence Jonson, fisiólogo del Servicio de Investigaciones Agrícolas de Beltsville en Maryland, ha sido fundamental para separar espermatozoides X y Y según su contenido de ADN. Nuevamente, es crucial considerar factores

como el estado nutricional, condición corporal, estado reproductivo y sanitario, así como la evaluación del espermatozoide (Puerto-Rodríguez, 2019).

La técnica de sexado de semen surgió como una respuesta a la necesidad de mejorar las ganaderías especializadas. Uno de sus objetivos principales fue aumentar el número de hembras en los hatos, ya que estas son cruciales para la producción en ganaderías especializadas. La inseminación artificial ha demostrado ser una herramienta muy beneficiosa para los grandes hatos de producción bovina, ya que aumenta la rentabilidad al proporcionar hembras de reemplazo, esenciales para mantener la producción de leche (Alfonso y Muñoz, 2018).

Alfonso y Muñoz (2018), junto con Puerto-Rodríguez (2019), detallan el proceso de semen sexado, que implica la separación de cromosomas X y Y, donde los cromosomas X poseen un 3.8% al 4% más de ADN. De esta manera, se determina que los cromosomas XX corresponden a hembras y los XY a machos.

Evolución técnica – Semen sexado

Variable	1990-1995	2003-2012	2012-2014
Velocidad del semen.	200 a 400 células por segundo	5000 células por segundo.	10.000 a 20.000 células por segundo.
% Pureza.	83%	85%	93%
Semen convencional.	70%	80%	90-95%
Rendimiento convencional de semen sexado.	1.000 dosis convencionales/100 sexadas	1.000 dosis convencionales/400 sexadas	1.000 dosis convencionales/1.100 sexadas

Nota. Tomado de Puerto-rodríguez, (2019)

En cuanto a la concentración de espermatozoides por pajilla, se estima que el 90% de ellos son hembras (Oses et al., 2009; Puerto-Rodríguez, 2019). Esto implica que, de cada 100 gestaciones

con semen sexado, aproximadamente 90 serán hembras y 10 serán machos. Estos resultados pueden tener un impacto significativo en la productividad de un hato, especialmente en el caso de una producción lechera (Puerto-Rodríguez, 2019).

2.1.4.3 Clonación

La clonación es una forma de reproducción asexual que ocurre en organismos unicelulares y plantas. Consiste en la creación de un animal idéntico a otro preexistente, y este proceso es viable únicamente en un entorno de laboratorio. Los individuos resultantes heredan las mismas características cromosómicas que el donante (Rodríguez et al., 2011), además de esto el mismo autor menciona que existen dos métodos distintos para llevar a cabo la clonación: la separación de células de un embrión en las primeras etapas de su multiplicación celular, o la sustitución del núcleo de un óvulo por el de otra célula de un individuo diferente.

Esta técnica implica la introducción de una célula de un donante en una célula sin núcleo, dando lugar a la formación de un nuevo embrión. Aunque se puede aplicar en especies en peligro de extinción, su realización presenta desafíos considerables, ya que la obtención y funcionalidad de una célula sin núcleo es una posibilidad bastante limitada. La clonación tuvo sus inicios hace más de 60 años con la reproducción de salamandras en el zoológico alemán Hans Spermann, y se aplicó posteriormente en animales domésticos en las décadas de 1980 y 1990, culminando con el nacimiento de la oveja Dolly, el primer individuo clonado a partir de una célula adulta (Gonzales et al., 2019).

Hasta el momento, no se han llevado a cabo estudios que demuestren la seguridad del consumo de leche y carne de animales clonados para los seres humanos, según lo señala la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (Rodríguez et al., 2011). No obstante, en 2008, la Administración Federal de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos concluyó que no

existen nuevos riesgos al consumir productos cárnicos o lácteos de animales provenientes de clones de ciertas especies de ganado bovino, porcino y caprino. Además, expertos en el tema opinan que no hay diferencia entre el consumo de productos de animales clonados y aquellos reproducidos de forma sexual o natural (Rodríguez et al., 2011).

2.1.4.4 Fertilización in vitro (FIV)

La técnica de fertilización in vitro (FIV) tuvo sus inicios en la década de 1970 en los Estados Unidos de América (Carazas, 2018) (Aragonés et al., 2022). Este avance generó un aumento significativo en el interés por mejorar la genética a través de embriones, lo que resultó en una mayor demanda de embriones a nivel mundial. Gracias a su aceptación, esta técnica ha evolucionado rápidamente en los últimos 30 años y siendo esta cada vez más utilizada y aceptada en laboratorios con el fin de producir animales de alta calidad genética que cumplan con los estándares productivos requeridos o esperados (Aragonés et al., 2022).

La FIV es una técnica de control asistido aplicada en mamíferos, basada en el co-cultivo de espermatozoides y oocitos en medios de maduración controlados. Esto tiene como objetivo promover la maduración de los oocitos para permitir la fertilización y la formación de embriones con propósitos productivos, reproductivos, de investigación y de producción de animales seleccionados (Fernández Reyes et al., 2010).

La etapa inicial de la producción in vitro (PIV) es la producción de los oocitos, y en esta fase se determina la calidad que tendrá el embrión. Es fundamental considerar que los medios de maduración in vitro (MIV) desempeñan un papel crucial en el desarrollo óptimo del embrión, ya que el tipo de medio utilizado constituye la base esencial para el desarrollo embrionario (Con et al., 2007).

Por otro lado, existe una técnica más tradicional y menos moderna, basada en criterios de selección de los ovarios. Entre estos criterios, se incluyen aspectos como la tonalidad del citoplasma, la morfología, la conservación, el número de capas que lo recubren y las células del cumulus. Esta técnica permite la recuperación de oocitos recolectados mediante la técnica de OPU. Gracias a esto, se puede llevar a cabo una selección para la producción de embriones de alta calidad genética. Esta técnica se realiza in vivo en el animal, y es posible realizar la superovulación con sincronización mediante la aplicación de hormonas, lo que facilita la recolección de oocitos de manera natural, aunque es menos eficiente (M. Grisales¹; J. Gómez; J. et al., 2010). En 2016, Aragonés et al. (2022) mencionaron que la producción de embriones in vitro superó la producción de embriones in vivo para ese año.

2.1.4.5 Criopreservación

Los procesos de crioconservación permiten la preservación de especies y facilitan la implementación de diversas técnicas de inseminación, lo que puede mejorar la producción y el rendimiento. Según Zhou et al. (2010), esta práctica conlleva beneficios prácticos, económicos y éticos que tienen un impacto positivo en distintos programas de conservación genética.

Méndez et al. (2020) señala que a mediados de los años 80 se introdujeron técnicas de congelación lenta, dando lugar a la crioconservación. Estos crioprotectores evitan la destrucción de la membrana celular y su cristalización. Aunque la crioconservación de oocitos es una técnica viable, es importante destacar que no alcanza la eficiencia comparada con los resultados obtenidos mediante la vitrificación embrionaria (Méndez et al., 2020).

Tharasanit & Thuwanut (2021) mencionan que la primera aplicación de la técnica de crioconservación tuvo lugar en la década de 1970, pero induce cambios celulares y moleculares inevitables, interviene en la tasa de fecundación y en el eficiente desarrollo embrionario, además

de esto la crioconservación implica la congelación utilizando concentraciones bajas de crioprotectores y métodos de enfriamiento lento para minimizar el daño a las células y durante este proceso, las células están expuestas a entornos que pueden afectar su funcionalidad debido a cambios de temperatura, factores osmóticos y toxicidad química.

El éxito de la crioconservación de oocitos está influenciado por diversos factores como la especie, edad, fertilidad y condiciones climáticas. Aunque se sigue un protocolo estándar, la viabilidad del proceso *in vitro* varía según el tipo de laboratorio, la técnica de extracción de oocitos, el manejo de la técnica de congelación y descongelación, todo con el fin de minimizar el impacto en la célula (Tharasanit & Thuwanut, 2021).

Bulgarelli et al. (2017) abordan la recuperación de ovarios para su conservación y fertilización *in vivo*. Estas técnicas, aunque complejas, deben llevarse a cabo en laboratorios con condiciones de preservación adecuadas para aumentar la viabilidad y reducir la pérdida embrionaria. La crioconservación de material genético surge como respuesta al crecimiento constante de la población mundial y a la necesidad de métodos eficientes de reproducción para satisfacer la demanda alimentaria de carne y leche.

Para comprender plenamente estos procesos, es crucial entender la crioconservación de material genético de machos, lo que implica la selección y aplicación de técnicas necesarias para llevar a cabo el proceso con éxito (Ugur et al., 2019). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la crioconservación de espermatozoides no siempre resulta eficaz ni viable, ya que muchos espermatozoides pueden sufrir daños fisiológicos y estructurales durante el proceso de congelación y descongelación, como menciona Ugur et al. (2019).

Somfai & Hirao (2021) destacan que las epidemias representan una amenaza significativa para los recursos genéticos de especies y razas específicas, especialmente aquellas que tienen una

distribución geográfica limitada. Por lo tanto, la crioconservación de embriones, gametos y espermatozoides se presenta como un proceso crucial en el campo de la biotecnología (Somfai & Hirao, 2021).

2.1.4.6 Vitricación

La vitricación es una técnica avanzada de conservación de recursos genéticos que implica la solidificación de la solución aplicada para evitar la formación de cristales. Para que esta técnica sea efectiva, es crucial contar con una curva rápida de ultracongelación y utilizar concentraciones adecuadas de crioprotectores para prevenir la cristalización (Zhou & Li, 2013). Esto posibilita la preservación de embriones para su uso futuro, considerando el medio de desarrollo específico y condiciones controladas, con el fin de evitar la pérdida de embriones y oocitos. La crioconservación de oocitos es una de las formas utilizadas para la preservación, aunque no ha alcanzado la eficiencia comparativa con la vitricación embrionaria (Méndez et al., 2020).

También puede definirse la vitricación como una técnica alternativa para la crioconservación de germoplasma, o células sexuales maduras de hembras; para este proceso se deben usar medios que garanticen el desarrollo y la supervivencia del oocito. La albúmina sérica bovina y el suero fetal bovino son insumos químicos utilizados para el protocolo actual de vitricación higiénica de muestras valiosas de oocitos que aún no se encuentran maduros. (Somfai & Hirao, 2021).

2.2 Biotecnologías asociadas al manejo de la hembra

2.2.1 Transferencia de embriones

En la producción de embriones, González et al. (2019) identifica la importancia de emplear procesos de biotecnología, como la recolección de ovarios, ya sea de animales vivos mediante la técnica de OPU, o de animales sacrificados en matadero. Posteriormente, se procede a la extracción folicular y se lleva a cabo la maduración in vivo, donde las células del cúmulo del ovocito

comienzan a expandirse en medios de maduración apropiados para prevenir su deterioro. Una vez que los ovocitos se desarrollan, se realiza la fertilización in vivo tras la descongelación y capacitación de los espermatozoides. Luego, se prosigue con el cultivo in vivo, seguido de la criopreservación y congelación de los embriones, preparándolos para su posterior transferencia a una receptora apta.

La técnica utilizada en la producción de embriones es conocida como técnica in vivo o MOET (Múltiple Ovulación Embryo Transfer). Esta técnica se basa en la superovulación con el fin de inducir múltiples ovulaciones en las hembras donantes. El propósito de esta técnica es obtener ovocitos de mayor calidad y eficiencia en la superovulación. Esta aplicación de la biotecnología ha sido una contribución significativa, ya que ha incrementado los índices reproductivos y ha demostrado ser invaluable para la humanidad.

Tabla 4

Programa de TE en el mundo

Continentes	Lavajes	Embriones Transferibles	No. De embriones es transferidos		
			Frescos	Cong/desc.	Total
África	1765	10005	3766	1949	5715
Asia	11519	74811	11684	38487	50171
Europa	26429	170451	54286	75494	129780
N. América	51224	299180	98391	99495	197886
Oceanía	15508	92655	29182	14626	43808
S. América	12719	92400	58423	34929	93352
Total	119164	739502	255732	264980	520712

Nota. Tomado de Sirard, (2014)

Tabla 5

Variaciones anuales de la tasa de embriones transferidos durante 9 años en 10 países de la Unión Europea.

Año	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Embriones Transferidos	56	54	57	58	58	60	60	65	55

Nota. Resultados obtenidos en 9 años de la cantidad de embriones transferidos por año, adoptado de Adaptado de Sirard (2014).

2.2.2 Técnica MOET

La técnica MOET comprende diversos procesos, tales como la superovulación, inseminación artificial a término fijo (IATF), procesos in vitro de embriones, desarrollo de embriones, congelación y transferencia de embriones esto se trata de tratamientos hormonales que inducen múltiples ovulaciones. Gracias a esta técnica, las hembras donadoras se utilizan con mayor frecuencia para la transferencia de embriones, especialmente aquellas con un alto potencial genético (Aldana & Pinilla, 2021). Sin embargo, el mismo autor resalta que esta técnica presenta ciertas limitaciones en cuanto a resultados, ya que el número de embriones obtenidos mediante lavado varía entre 4 a 6 embriones. Es importante considerar que las hembras deben estar en óptimas condiciones de desarrollo y bien alimentadas. Además, no todas las hembras utilizadas para esta técnica cumplen con el rendimiento esperado. Es necesario proporcionar períodos de descanso o recuperación entre dos tratamientos de superovulación. También es crucial tener en cuenta que la falta de resultados esperados puede deberse a problemas de infertilidad, tanto infecciosos como derivados de la infertilidad del macho donante de semen y enfermedades reproductivas que pueden afectar el proceso. Por estas razones, esta técnica a menudo puede resultar en fracasos o tener resultados menos satisfactorios.

2.2.3 Colecta y manejo de ovarios

Se procede a realizar cortes transversales y longitudinales con una hoja de bisturí estéril con el propósito de extraer el líquido folicular, el cual será analizado para la obtención de oocitos (Fernández Reyes et al., 2010).

Para la obtención de Complejos Cumulus Oocito (COCs), se emplean hojas de bisturí estériles realizando cortes sucesivos, tanto transversales como longitudinales, en folículos que oscilan entre 3 a 5 mm. Posteriormente, se efectúa un lavado del folículo y el fluido resultante se deposita en una caja de Petri para su análisis preliminar (Fernández Reyes et al., 2010).

La técnica de slicing, que implica un lavado directo del contenido del folículo a una caja de Petri para su posterior análisis, permite la recuperación de más células del Complejo Cumulus Ovocito (COC) por ovario. Esta técnica es especialmente útil en novillas, cuyos ovarios y folículos son de menor tamaño que los de las vacas adultas.

En los resultados del estudio de Ortega (2016), se observó que la técnica de slicing del ovario logró una mayor cantidad de ovocitos recuperados, alcanzando un 55.49%. Sin embargo, en términos de calidad, la técnica de aspiración folicular superó, obteniendo un 46.4% de ovocitos aptos para la producción de embriones in vitro.

2.2.4 Transporte de ovarios

Los ovarios recolectados post mortem se someten a múltiples lavados con solución de cloruro de sodio o solución salina al 0,9%, y luego se colocan en bolsas de polietileno de 10 x 35 cm. Cada bolsa contiene suero fisiológico al 0,9% con un añadido de antibióticos. Estos ovarios son transportados en termos a una temperatura de 39°C, asegurando así una temperatura cercana a la fisiología de la vaca (Carazas, 2018).

Los ovarios provienen de una planta de beneficio certificada y se transportan a una temperatura controlada entre 35 a 37°C, garantizando que el tiempo de transporte post mortem no exceda las 3 horas (Méndez et al., 2020). En el estudio de Vargas et al., (2021), los ovarios recolectados en la planta de beneficio se transportaron en un termo o cabaña, conteniendo un litro de suero fisiológico enriquecido con albúmina sérica bovina y antibióticos, manteniendo una temperatura de 38.5°C. Se tuvo especial cuidado de que el tiempo de transporte no excediera las 4 horas después del fallecimiento del animal.

2.2.5 Clasificación de folículos

Para la clasificación de los folículos presentes en los ovarios, estos presentan una escala de clasificación propuesta por Boni (2012) donde A-C COC se asocia con una mayor precisión de la calidad del folículo; los A-COC se encuentran principalmente en folículos no atrésicos y raramente se podrán encontrar en folículos muy atrésicos, los C-COC se encuentran sobre todo en folículos muy atrésicos y nunca en folículos no atrésicos, los B-COC aumentan progresivamente de folículos no atrésicos a folículos muy atrésicos, esto proporciona información sobre el potencial de desarrollo in vitro.

De acuerdo con Narváez et al. (2019), la determinación de clasificación de oocitos se dio en 5 categorías de la siguiente manera: < 4 mm, > 4 a ≤ 6 mm, > 6 a ≤ 9 mm, > 9 a ≤ 12 mm y > 12 mm, esta clasificación se dio mediante un calibrador de corredera, cabe resaltar que los diámetros de los folículos observados en la superficie del ovario, no corresponde con el diámetro total del folículo, ya que no es posible medir la profundidad.

Quispe et al. (2018) mencionan que los oocitos se pueden recuperar de vacas sacrificadas o donantes vivas; la técnica de aspiración folicular in vivo (OPU) es guiada por ultrasonografía,

gracias a esto se determinó que todos los folículos con un tamaño mayor a 2 a 8 mm se perforaron y el contenido fue recolectaron en tubos estériles de 50ml.

Tabla 6

Desarrollo folicular y sus características y modificaciones

Desarrollo folicular.	Características.	Modificaciones.
folículo primordial	Rodeado de una pequeña capa de pequeñas células foliculares planas, que dan origen a las células de la granulosa. El incremento en el tamaño del ovocito,	constituido por el ovocito
Folículo primario	un cambio en la forma de las células foliculares, que pasan de planas a cúbicas y el comienzo de la formación de la zona pelúcida primario se identifican por la multiplicación de las células cúbicas y la invasión de una red de capilares entre las células que rodean el folículo, aportando los nutrientes a la membrana granulosa y al ovocito.	Constituido por el ovocito y cambios de tamaño
Folículos secundarios	Sucedde la aparición del espacio folicular o antro folicular, el líquido presente en esta cavidad se denomina licor folicular	Constituido por el ovocito y cambios de tamaño
Folículos terciarios	Sucedde la aparición del folículo pré ovulatorio o De Graff, que es un folículo terciario que está en capacidades de ovular.	

Nota. Adaptado de M Grisales; J, Gómez; J et al., (2010).

El crecimiento folicular, como señala Sirard (2014), pasa de depender de la FSH a depender de la LH. En vacas, los folículos dominantes tienen una duración de aproximadamente 5 días y pueden alcanzar un diámetro de 8,5 mm o más. Se les llama "dominantes" porque en la onda folicular son más grandes que los demás folículos. Los otros folículos pueden estar en proceso de reclutamiento o selección. En el caso de las vacas, los folículos que llegan a la etapa de selección

también pueden convertirse en folículos dominantes si superan el proceso de dominancia, de lo contrario, entran en un proceso de atresia.

Durante la fase de desarrollo del folículo, el aumento del diámetro folicular se debe principalmente a la proliferación de las células de la granulosa. Como menciona Sirard (2014), en el folículo primario, la capa de células de la granulosa es relativamente pequeña, lo que resulta en un crecimiento inicial muy lento.

En el caso de las ratas, el ciclo ovárico dura de 4 a 5 días, y algunos folículos muy pequeños con menos de cuatro células de la granulosa pueden haber crecido de una sola célula en un lapso de 7 días. Sin embargo, en bovinos y ovinos, se estima que transcurren alrededor de 6 meses desde la activación del folículo primordial hasta la ovulación, por lo tanto, se concluye que en el ganado bovino se requieren al menos dos ciclos estrales para que un folículo crezca a través de la fase antral y alcance el tamaño preovulatorio necesario.

2.2.6 *Ovum pick-up (OPU)*

La técnica de obtención de ovocitos, conocida como Ovum Pick-Up (OPU), fue desarrollada alrededor de 1980 para extraer ovocitos de ganado vivo y posteriormente se aplicó en humanos para tratar la infertilidad (Ali, 2021). Este procedimiento, guiado por ultrasonografía, consiste en una aspiración transvaginal no invasiva que permite obtener ovocitos antrales de animales vivos. Es la técnica más utilizada y efectiva para obtener ovocitos de donantes vivas con un alto potencial genético, facilitando su posterior fertilización y desarrollo in-vivo (Ali, 2021).

La aspiración folicular guiada por ultrasonografía, desarrollada a finales de la década de 1980, se ha convertido en una de las técnicas predominantes para recolectar ovocitos de ganado vivo (Aldana & Pinilla, 2021). Esta técnica, también conocida como OPU, implica un tratamiento hormonal para lograr la superovulación del animal (Aragonés et al., 2022).

La OPU, realizada a través de ultrasonografía, consiste en la aspiración folicular al vacío mediante punciones transvaginales guiadas. Esto ha revolucionado la posibilidad de realizar donaciones de hembras con excelente genética mientras están vivas. Anteriormente, la aspiración folicular solo se podía llevar a cabo en ovarios de hembras post mortem (Aldana & Pinilla, 2021).

Aldana & Pinilla, (2021). Se ha determinado mediante un estudio que el número total anual de colecciones de OPU en los Estados Unidos creció de 2,000 colecciones en 2000 a 32,000 colecciones en 2015, estos oocitos obtenidos mediante la técnica OPU permiten ser desarrollados y fertilizados en laboratorios mediante cultivos in vivo durante periodos de 7 días, en este día se hace una selección de los embriones que son viables para hacer la respectiva transferencia, pero si no se van utilizar todos, se realizara la respectiva conservación de los embriones ,mediante congelación(Aldana & Pinilla, 2021).

Recientes investigaciones han centrado sus esfuerzos en mejorar las técnicas in vivo. Un estudio en Turquía indica que el 72.68% (1.031.567) de los embriones bovinos producidos en 2019 fueron generados in vitro, de los cuales 1.010.680 provinieron de OPU y 20.887 de material de matadero, además, esta información respalda la viabilidad de obtener genética de alta calidad de animales para su reproducción, destacando la importancia de la estructura de las capas de la granulosa que rodean el ovocito en el desarrollo embrionario y cabe mencionar que factores como la fisiología animal, el comportamiento y la nutrición desempeñan un papel crucial en la obtención de recursos (Çizmeçi et al., 2021).

Se debe tener en cuenta que para la realización de este proceso, se necesitan técnicas de biotecnología y así mismo contar con los equipos adecuados, los cuales pueden ser un poco costosa su adquisición, los equipos que se necesitan son bomba de aspiración equipo de ultrasonografía, sistema guiado de aguja hipodérmica desechable calibre 18, tubo colector, así mismo teniendo los

equipos y materiales adecuados, para que se dé la correcta aspiración folicular se debe contar con una presión de entre 50-85 mm Hg y tener una temperatura óptima de 38°C, ya que los oocitos se encuentran dentro de la vaca donante a esta temperatura (Aldana & Pinilla, 2021)

2.2.7 Colecta post mortem

La aspiración folicular permite puncionar folículos mayores a 3 mm, los cuales son visibles en la superficie ovárica de hembras adultas. Sin embargo, en este proceso se pierden algunas células del cúmulus y la cantidad de Complejos Cumulus Oocito (COC) recuperados es menor que con otras técnicas (Lorenzo et al., 2015).

En comparación con la técnica de aspiración folicular, el método de Slicing del ovario demostró un mejor rendimiento en cuanto a la cantidad de ovocitos recuperados, alcanzando un 55.49%. No obstante, en términos de calidad, la técnica de aspiración folicular obtuvo un 46.4% de ovocitos aptos para la producción de embriones in vitro.

Para llevar a cabo la aspiración, se emplea una aguja de calibre 18G junto con una jeringa de 10 ml, conforme se describe en el trabajo de Benitez D. y colaboradores (2019). Este método ha mostrado resultados superiores en la obtención de oocitos en comparación con la técnica de aspiración por corte o sliding.

En su estudio, Méndez et al. (2020) lleva a cabo la aspiración del líquido folicular mediante punciones directas con una aguja calibre 18 y una jeringa desechable de 12 ml. El contenido recuperado es posteriormente analizado bajo microscopio para determinar la presencia de oocitos. La aspiración del líquido folicular, según Ferré et al. (2020), se realiza mediante una punción con una jeringa de 5 ml y una aguja de calibre 18G. Este enfoque busca asegurar una aspiración precisa y la recolección óptima del líquido folicular.

2.2.8 Utilización de oocitos

La maduración y fertilización in vitro son técnicas que han experimentado mejoras significativas a lo largo de los años, permitiendo la utilización de animales con un elevado valor genético. Esto es especialmente relevante debido a que algunos animales pueden enfrentar desafíos reproductivos, como señala Echeverry (2018).

La capacitación de los oocitos está influenciada por el desarrollo de las células que los rodean. Factores determinantes para este desarrollo y capacitación han sido identificados por Quispe et al. (2018), quien a su vez enmarca que estas células pueden desarrollarse in vivo, un proceso que depende de la fisiología de la donante, el tamaño de los folículos, la extracción de los oocitos y la integridad de las células del cúmulo y concluyendo que el éxito en la obtención de embriones está directamente relacionado con el desarrollo y viabilidad de los oocitos.

Para la conservación de los oocitos, existen diversas técnicas como la vitrificación o la congelación, utilizando curvas de congelación que pueden ser lentas, rápidas o ultrarrápidas. Estas técnicas son fundamentales para prevenir la cristalización del material genético y minimizar el daño en la membrana del oocito, ya que cambios bruscos en el proceso pueden resultar en la pérdida de viabilidad (Tharasanit & Thuwanut, 2021).

2.2.9 Clasificación de oocitos

La clasificación de los oocitos se basa en varios criterios, incluyendo su composición celular, su estructura morfológica y la distribución del núcleo entre las células de la granulosa (Narváez et al., 2019). Otros estudios, como los de Of & Graphics (2010) y Quispe et al. (2018), mencionan diferentes categorías, como grado 1, grado 2, grado 3, atrofiado, expandido y degenerado, que dependen de la conformación y número de células en la capa del cúmulo.

Por otro lado, Estrella et al. (2017) argumentan que la clasificación de oocitos se realiza en base a la calidad AB. Los oocitos de calidad A son considerados aptos, ya que poseen múltiples capas de células de cúmulos bien desarrolladas, citoplasma homogéneo y fino. Por otro lado, los oocitos de calidad C se consideran no aptos ni viables, ya que presentan desnudez o cúmulos completamente expandidos y el citoplasma con áreas claras o muy oscuras. Es importante señalar que esta clasificación es subjetiva y se basa en la morfología de los oocitos.

En el estudio de Alvarado et al. (2020), se propone una clasificación morfológica diferente para los oocitos bovinos: A, B y C. Los oocitos de categoría A tienen tres o más células del cúmulus y son considerados viables. Los oocitos de categoría B presentan algunas células del cúmulus y siguen siendo viables, aunque en menor proporción que los de morfología A. Por último, los oocitos de categoría C carecen de células del cúmulus y muestran exposición del citoplasma, lo que los hace no viables para la fecundación in-vivo.

En cuanto a la recolección de ovarios, Narváez et al. (2019) caracterizan los folículos por su superficie, consistencia y color. Los ovarios con cuerpo lúteo (CCL) se clasifican como A y B, mientras que los folículos sin cuerpo lúteo (SCL) se categorizan como C.

Boni (2012) y Tinco et al. (2021) proponen una clasificación basada en letras (A, B, C), que depende de las medidas de los folículos en los ovarios. A corresponde a folículos mayores de 10 mm de diámetro, B implica que el ovario debe tener más de 10 folículos, con un diámetro de 2 a 5 mm, sin folículos mayores de 10 mm de diámetro. C se refiere a ovarios con menos de 10 folículos sin atresia, y con un diámetro de 2 a 5 mm, sin folículos mayores de 10 mm de diámetro.

Martínez (2013) y Castillo & Mantilla (2020) proponen una clasificación de oocitos en categorías A, B, C, D. A incluye oocitos completamente rodeados de células del cúmulus con más de 4 capas. B comprende oocitos completamente rodeados por células del cúmulus con 1 a 3 capas.

C consiste en oocitos desnudos sin ninguna capa de célula del cúmulus y citoplasma oscuro. D corresponde a oocitos expandidos con células del cúmulus no compactas y citoplasma irregular.

Álvarez et al. (2022) utilizan una clasificación basada en tres grados: GI, GII y GIII. Los ovocitos de grado I y II se consideran viables y pertenecen a las categorías GI y GII, respectivamente. Grado III corresponde a ovocitos no viables. Grisales, Gómez, y otros (2010) también proponen una clasificación con tres tipos: I, II, III. Tipo I consiste en más de 6 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo. Tipo II incluye 3 a 6 capas de células del cúmulus y/o citoplasma no tan homogéneo. Tipo III abarca 1-3 capas de células del cúmulus y/o citoplasma poco homogéneo.

2.2.10 Morfología del oocito

La calidad del oocito se determina por la capacidad que este tiene para producir un blastocisto en un sistema de fertilización de laboratorio in vivo, Algunas investigaciones mencionadas por Quispe et al., (2018) describen que la capacidad del oocito para ser viables es la capacidad que este tiene para capacitarse y desarrollarse al estado de blastocisto, esto va determinado por el estado físico, reproductivo de las vacas donantes, así como el tamaño del folículo del cual se extrajo el oocito, el tamaño del folículo y las capas que lo componen.

2.2.11 Morfología del oocito maduro

El oocito en bovinos, como menciona Salinas (2016), se caracteriza por estar aislado de su folículo y poseer un núcleo grande ubicado en la periferia, rodeado por la membrana nuclear. En este estado, conocido como dictioteno meiótico, los orgánulos citoplasmáticos se distribuyen en todo el citoplasma de la célula. En la región central se encuentran los gránulos corticales, el

retículo endoplasmático rugoso, el aparato de Golgi y los lisosomas, mientras que en la periferia se sitúa la mitocondria.

2.2.12 Complejo cúmulus oocito

El análisis del Complejo Cumulo-Oocito (COC) se lleva a cabo evaluando oocitos que presenten células del cúmulo claramente visibles y uniformes, además de contar con más de tres capas. De acuerdo con la clasificación propuesta por Held et al. (2012), los oocitos con tres capas o más se consideran de calidad 1, aquellos con dos capas se clasifican como calidad 2, mientras que los oocitos con una capa o menos son categorizados como calidad 3, presentando una viabilidad más baja.

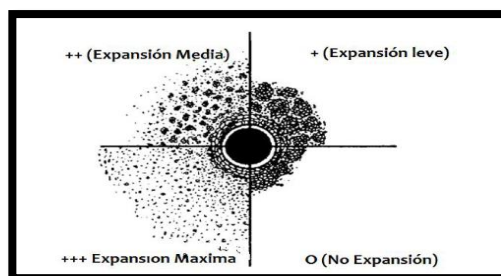
El criterio de expansión de los cúmulos es el siguiente:

Expansión nula. No existe expansión apreciable del cúmulo intracelular (Salinas, 2016).

- Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del oocito intracelular (Salinas, 2016).
- Expansión apreciable, de unos dos diámetros del oocito intracelular (Salinas, 2016).
- Expansión máxima, de más de tres diámetros del oocito, e incluso de las células de la corona radiada intracelular (Salinas, 2016).

Figura 1

Expansión de las células del cumulus



Nota. Tomado de Salinas, (2016).

2.2.13 Zona pelúcida

La zona pelúcida se refiere a una matriz extracelular porosa y trabecular compuesta por estructuras fibroglandulares que rodean el oocito en mamíferos. Cumple funciones cruciales en el desarrollo de la fecundación y en las primeras etapas embrionarias (Riquelme & De Los Reyes Solovera, 2004), (Mukrimaa et al., 2016). Esta zona, conocida como Zona Pelúcida (ZP), forma una capa que separa el oolema de la región más interna del folículo, conocida como corona radiada. Además, presenta prolongaciones celulares que atraviesan la zona pelúcida y establecen conexiones con las membranas plasmáticas del oocito (Palma, 2000).

2.2.14 Función de la zona pelúcida

La zona pelúcida (ZP) es la membrana externa que cumple un papel crucial al proteger al oocito. Su función principal y una de las más significativas es facilitar la entrada del espermatozoide para llevar a cabo la fecundación del óvulo. Posteriormente, durante el proceso de eclosión, el blastocisto se libera de la zona pelúcida para permitir la implantación en el útero. Este proceso, conocido como polispermia, se encarga de prevenir la entrada de múltiples espermatozoides antes y después de la fertilización (Aragonés et al., 2022).

Durante el desarrollo embrionario, se inicia la desagregación de los blastocitos no compactos de la zona pelúcida, lo que permite la fijación temprana en las superficies del oviducto y el endometrio, conocida como implantación. Además de su papel en la fecundación, la zona pelúcida desempeña una función crucial en la protección del oocito y, posteriormente, del embrión durante la fase de implantación. Actúa como una barrera ante toxinas, xenobióticos, bacterias y virus, previniendo así la fagocitosis (Aragonés et al., 2022) (Riquelme & De Los Reyes Solovera, 2004). Durante la implantación, la zona pelúcida facilita las señales entre el embrión y el útero (Riquelme & De Los Reyes Solovera, 2004)

2.2.15 Características morfológicas de la zona pelúcida

La matriz de la zona pelúcida en mamíferos destaca por su tamaño relativo, siendo aún más pronunciada que otras matrices extracelulares. Esta dimensión varía según la especie. Por ejemplo, en ratones (*Mus musculus*) puede tener alrededor de 5 μm , mientras que, en seres humanos, oscila entre 13 y 16 μm . En cerdas y vacas, puede alcanzar hasta 27 μm (Riquelme & De Los Reyes Solovera, 2004).

La naturaleza porosa de la zona pelúcida permite la permeabilidad de moléculas tanto grandes, como las inmunoglobulinas y la ferritina, como de tamaño más reducido, como la heparina. Sin embargo, es importante destacar que la permeabilidad no depende únicamente del tamaño de la molécula, sino también de las necesidades y requisitos bioquímicos y fisiológicos del proceso (Riquelme & De Los Reyes Solovera, 2004).

Tabla 7

Clasificación de las proteínas de la zona pelúcida

Clasificación de las proteínas de la zona pelúcida (ZP)					
Ratón.	Humano.	Porcino.	Conejo.	Felino.	Canino.
ZP1	ZPB	ZP3	R55	ZPB	ZP1
ZP2	ZP2	ZP2	R75	ZPA	ZP2
ZP3	ZP3		ZPC		ZP3

Nota. Tomado de Riquelme & De Los Reyes Solovera, (2004).

3 Metodología

3.1 Ubicación

La investigación se realizó en el laboratorio de biología y en el laboratorio de reproducción de la Universidad Industrial de Santander la cual se encuentra ubicada en las siguientes coordenadas 72°43'45" W, 6°42'35" N en el municipio de Málaga Santander.

3.2 Material Biológico

Se obtuvieron ovarios de hembras bovinas sacrificadas en la planta de beneficio ubicada en la provincia de García Rovira, con código 315B/362P en Málaga Santander. Se seleccionaron ovarios de hembras maduras que no se encontraban en estado de gestación. Estos ovarios fueron recolectados y transportados a una temperatura de 37°C y luego almacenados en bolsas de poliestireno herméticamente selladas suspendidas en solución salina al 0,9%. Los ovarios fueron transportados en una cava de icopor hasta el laboratorio de reproducción donde se llevó a cabo su procesamiento. De una población de 128 vacas beneficiadas en la planta de beneficio de García Rovira se recolectaron 246 ovarios los cuales se enmarcaron como unidades experimentales y se clasificaron según su posición anatómica (derecha o izquierda).

3.3 Procedimiento de laboratorio

Después de la obtención de los ovarios, se procedió a realizar un lavado minucioso con solución salina a una temperatura de 37°C antes de su utilización. Para la recolección de los oocitos se empleó el método de aspiración el cual consistió en la aspiración de oocitos utilizando una jeringa de 5 ml y una aguja calibre 18G. La colecta de oocitos se llevó a cabo considerando su tamaño o diámetro folicular, estos fueron clasificándolos en tres grupos: 1-4 mm, 4-8 mm y

mayores de 8 mm. Los oocitos recuperados fueron suspendidos en una solución de mantenimiento y depositados en cajas de Petri previamente esterilizadas. Posteriormente, se procedió a la evaluación de los oocitos utilizando un microscopio binocular equipado con un sistema ZEISS ZEN 3.7® y un objetivo de 10X, seguido de la documentación fotográfica.

3.4 Análisis de la imagen

Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software equipo ZEISS ZEN 3.7® y se determinaron las variables morfológicas asociadas a la estructura del oocito (citoplasma, corona radial, células del cúmulo, su Diámetro (μm), longitud (μm), área total (μm^2) y área núcleo (μm^2).

3.5 Análisis estadístico

Los datos correspondientes a las medidas morfométricas de los oocitos fueron procesados utilizando el software estadístico SAS University® 2023. Los datos fueron homogenizados mediante el logaritmo en base 10 para disminuir el coeficiente de variación. ($\text{CV}>35\%$). Se aplicó un análisis descriptivo para comprender el comportamiento de las distintas variables mediante un análisis de frecuencia se determinó la presencia ausencia de folículos, y/o oocitos. Así mismo, se realizó un análisis de varianza con una vía de clasificación ANOVA para determinar si existían diferencias morfométricas en las diferentes categorías. Para evaluar las diferencias entre las medias, se empleó la prueba de Tukey con una confianza del 95%.

4 Resultados y discusión

Objetivo 1: Evaluar la capacidad de recolección de oocitos acorde a su ubicación anatómica mediante la técnica de aspiración folicular en ovarios obtenidos en planta de beneficio.

Durante la recolección de los ovarios se tuvo en cuenta la ubicación anatómica, ovario derecho (OD) y ovario izquierdo (OI), las cuales fueron posicionadas en bolsas de poliestireno con su respectiva marcación.

Durante la recolección de los ovarios, se garantizó que los sistemas reproductivos no estuvieran en estado de gestación. Cada ovario fue etiquetado con su posición anatómica y marcado con una letra del abecedario para su identificación. Se verificó que ambos ovarios estuvieran en óptimas condiciones en todas las hembras. Del total de ovarios recolectados, el 80% pertenecían a vacas en pubertad que aún no habían experimentado su primera monta, determinado por el tamaño de los cuernos uterinos y la evaluación general del aparato reproductivo. El 20% restante correspondía a ovarios de vacas que habían gestado previamente.

Se determinó el número de folículos presentes en cada uno de los ovarios (derecho e izquierdo) y fueron clasificados en función de su tamaño. Los folículos dependiendo su diámetro se clasificaron de la siguiente manera, pequeños (<4mm), medianos (4-8 mm) y grandes (>8mm). La medición del tamaño de los folículos se llevó a cabo utilizando un pie de rey para obtener medidas precisas en milímetros. El total de folículos analizados se presentan en la tabla 9, allí se muestra que el 83,75% pertenecen a la clasificación de <4mm y dentro de esta clasificación, el 57,32 % se encontraron dentro del ovario derecho y el 42,68 % se encontraron dentro del ovario izquierdo, además de esto el 12,49 % del total de folículos analizados se presentaron dentro de la clasificación de 4-8 mm de lo cual se evidencio que el 51,99 % pertenece al ovario izquierdo y el 48,01 % pertenece al ovario derecho y el porcentaje de folículos pertenecientes a la clasificación

>8mm fue de 4,44 % de lo cual dentro de esta clasificación el 51,14 % se encontraron dentro del ovario derecho y el 48,86 % se encontraron en el ovario izquierdo y al presentarse un análisis promedio de folículos por ovario, se identificó que en el ovario derecho presento una mayor cantidad de folículos (56,15 %) a comparación del ovario izquierdo en el cual se identificó un 43,85% del total de folículos analizados.

Tabla 8

Número de folículos encontrados en los ovarios analizados

Ubicación anatómica del ovario.	N° Ovarios	N° Folículos			TOTAL
		Pequeños <4mm	Medianos 4-8 mm	Grandes >8mm	
Derecho	123	1277	161	68	1506
Izquierdo	123	951	174	51	1176
TOTAL	246	2228	335	119	2682

Nota. Esta tabla presenta la cantidad de folículos presentes en los ovarios y estas medidas se obtuvieron en milímetros. Fuente propia.

Estrella et al. (2017), presentó en su estudio una clasificación igual de los folículos, encontrando que la presencia de la clasificación <4 mm se encontró que solo el 49,06 % de los folículos encontrados pertenecían a esta categoría, además de esto para la escala de 4-8 mm se encontró un 42,5 % de presencia de folículos y para la escala > 8 mm existía menor cantidad de folículos. Existen otras categorías para evaluar los folículos (Ortega, 2016), (Neira-Rivera et al., 2022); Vargas et al., (2021) utilizaron una categoría de e 2-6 mm. En el estudio de Salinas (2016) se abordó la clasificación de los ovarios (derecho e izquierdo), mostrando una viabilidad media de oocitos del 72,92% obtenidos del ovario derecho, seguido por el ovario izquierdo con un 63,52% de oocitos viables para la fecundación in vitro. Teniendo presente estos valores es importante tener como referente el ovario y el tamaño de folículo para determinar la viabilidad de oocitos.

Objetivo 2: Determinar la similitud entre categorías cualitativas y mediciones in vivo sobre la morfometría de oocitos obtenidos en planta de beneficio.

La clasificación de los oocitos fue determinada por los respectivos análisis realizados en laboratorio de lo cual los oocitos se pudieron clasificar en 4 categorías, tanto por medidas morfométricas (Tabla 10) como características visuales identificadas a lo largo del estudio. En la categoría A, se identifica un oocito con buenas características en su conformación dada por las células de la granulosa, la cual tiene como función brindar nutrientes que ayuden al mantenimiento del oocito y siendo este compacto y viable para procesos de fecundación in vitro. La categoría B: presenta una corona radiada un poco menos uniforme y compacta a comparación de la categoría A, más sin embargo la viabilidad de fertilidad es buena, categoría C: la corona radiada no es tan marcada, se encuentra más dispersa y el antro se encuentra mas expuesto. Clasificación D: dentro de esta clasificación el antro carece en mas del 70 % de la corona radiada, presentando así una baja posibilidad de ser apto para fertilización in vitro.

Los oocitos recolectados fueron clasificados en las categorías A,B,C, y D, de acuerdo a la metodología ya descrita, todos los oocitos fueron medidos en diámetro del antro, diámetro del antro y longitud de la zona pelucida, diámetro de la corona radiada y área de la corona radiada, Para las viables de diámetro del antro, diámetro del antro y longitud de la zona pelúcida el análisis estadístico no presentó diferencias significativas entre las diferentes categorías. Quintana et al., (2012), analizaron datos para el diámetro del citoplasma o antro y lo clasifico en inmaduros y maduros para la especie bufalina, durante el análisis de estos datos de identifico que presentaron diámetros de 145,21 μm y 148,46 μm , siendo de esta manera datos muy superiores a los obtenidos durante el estudio.

Tabla 9*Medidas morfométricas de oocitos Bovinos*

Medidas.	A	B	C	D	P	CV
Área del antro (μm^2)	5877,24 \pm 1697,92 ^a	5877,99 \pm 1766,75 ^a	5620,35 \pm 2147,73 ^a	5582,61 \pm 1933,02 ^a	0.8507	32,780
Diámetro del antro (μm)	91,011 \pm 20,73 ^a	91,31 \pm 23,35 ^a	92,95 \pm 31,13 _a	88,17 \pm 22,2 ^a	0.9294	27,58
Zona pelúcida (μm)	13,787 \pm 3,85 ^a	13,02 \pm 4,24 ^a	13,66 \pm 4,98 ^a	11,65 \pm 5,11 ^a	0.3711	33,47
Log Área						
Corona Radiada (μm)	4,81 \pm 0,41 ^a	4,78 \pm 0,23 ^{ab}	4,5 \pm 0,52 ^b	4,46 \pm 0,34 ^b	0.0002	8,46
Área Corona Radiada (μm^2)	90164,26 \pm 69718,18 ^a	69726,76 \pm 36235,52 ^{ab}	45457,76 \pm 23768,91 ^b	38381,41 \pm 28047,53 ^b	<.0001	69,21
Log Diámetro						
Corona Radiada (μm)	2.08 \pm 0,2 ^a	1,99 \pm 0,14 ^b	1,86 \pm 0,18 ^c	1,59 \pm 0,14 ^d	<.0001	9,04
Diámetro Corona Radiada (μm)	134,77 \pm 60,68 ^a	103,32 \pm 33,94 _b	79,96 \pm 31,59 _c	41,63 \pm 16,48 _d	<.0001	42,08

Nota. Se tomaron medidas morfométricas en micrómetros (μm) y micrómetros cuadrados (μm^2), de algunas de las estructuras de las cuales se encuentra conformado el oocito. Fuente propia.

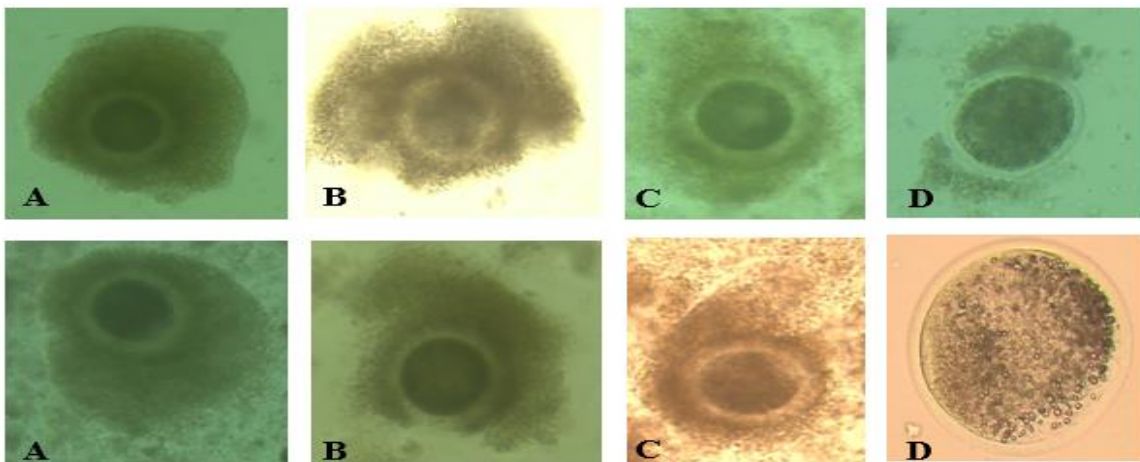
Palma, (2000) identificó diferencias de la zona pelúcida para diferentes especies como el marsupial que presenta medidas de la zona pelucida entre 1-2 μm), el ratón entre 6 μm , y humanos y porcinos entre 13-16 μm , y para bovinos de hasta 27 μm , valor muy superior a lo obtenido en el estudio los cuales se acercaron más hacia los valores reportados para la especie bovina. Por otra parte, datos obtenidos por Quintana et al., (2012) demostraron que la zona pelúcida en *Bubalus bulabis* en Cuba tenían una zona pelúcida para oocitos inmaduro de 7,85 μm siendo de esta manera menor a los datos obtenidos en el estudio, pero, al analizar el diámetro de la zona película en oocitos maduros se evidencio que presento un diámetro de 17,79 μm , siendo este un valor muy superior a lo obtenido por este autor. Acorde a lo anterior, se considera que la medición de la zona pelucida durante la valoración debe incluir variables cuantitativo sobre su morfometría, esto

teniendo como referente que pueden asociarse sobre la maduración del mismo, y la valoración cualitativa normalmente utilizada puede sesgar su valoración.

Teniendo en cuenta que la variable área de la corona radiada presento un coeficiente de variación por encima del 69% dada el principio de la medición, se realizó una normalización de los datos utilizando el logaritmo en base 10.

Figura 2

Categorización de los oocitos según criterios cualitativos



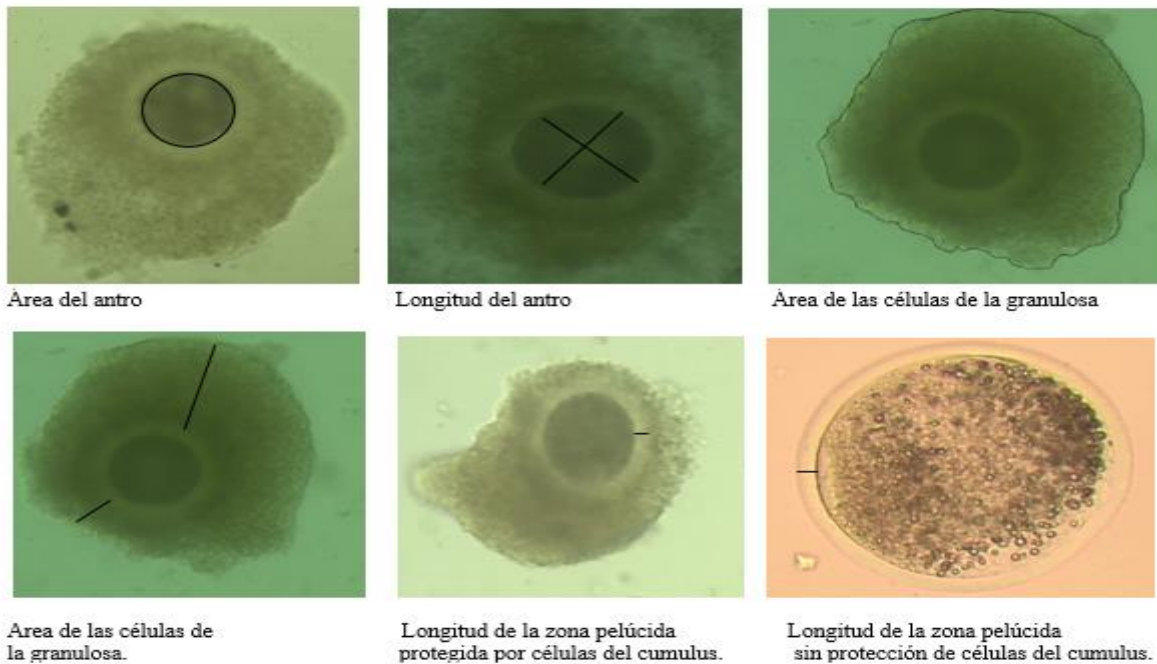
Nota. Se presenta la categorización de oocitos según criterios cualitativos analizados en el estudio en los cuales se evidencia la integridad de los mismos.

Allí, se evidencio que los oocitos que habían sido categorizados como A son diferentes a los tipo C y D ($P < 0,05$), sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa entra las categorías A y B; Quintana et al., (2012) datos para la especie bufalina evidenció valores de la corona radiada en ovocitos inmaduro y maduros de $145,21 \mu\text{m}$ y $148,46 \mu\text{m}$, respectivamente y al comparar los datos obtenidos en el estudio se puede deducir que la corona radiada en inferior a los datos presentados. Alvarado et al., (2020), mostro que al recuperar oocitos por aspiración los tipos A presentaron un mayor diámetro en su corona radiada, de igual manera, para la clasificación tipo B

los datos obtenidos por el autor son superiores a los reportados en el estudio y se presentó la misma tendencia para la clasificación tipo C. Rodríguez Zamora, (2013) muestra que los valores de la corona radiada cambian cuando los oocitos son obtenidos por novillas o hembras adultas.

Figura 3

Mediciones morfométricas de oocitos en micras



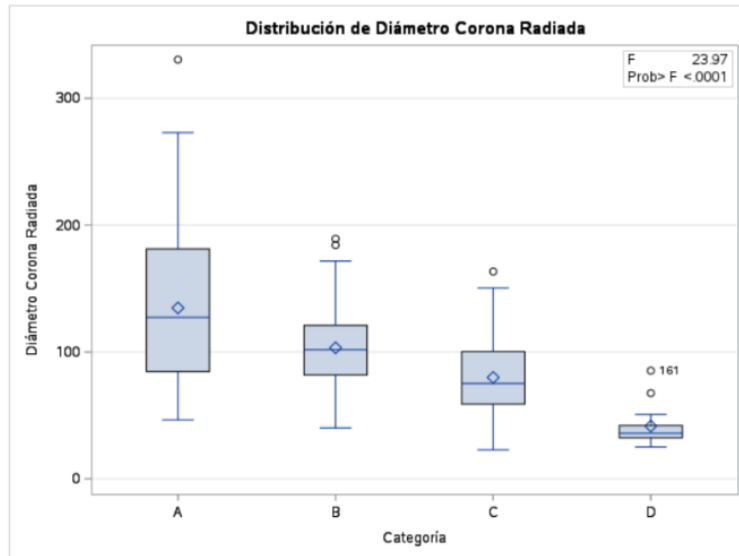
Nota. Se presentan algunas de las mediciones morfométricas realizadas a los oocitos bovinos.

Ortega (2016) y Carazas (2018) utilizaron una clasificación que relaciona las categorías A como excelentes, B como buenos, C como regulares y D como degenerados o no funcionales siendo parecido a lo comparado en nuestro estudio de Filipiak y Larocca (2016) proponen una clasificación en la cual los oocitos de categoría A presentan más de tres capas de células del cúmulo y citoplasma homogéneo, los de categoría B muestran una regularidad con parcial cobertura de células del cúmulo o citoplasma irregular, los de categoría C se consideran malos y se encuentran

desnudos, mientras que los de categoría D se clasifican como degenerados y están rodeados por fibrinas, dándoles un aspecto similar a telarañas. Sin embargo, las clasificaciones cualitativas no pueden describir al oocito dada su integridad y su funcionalidad.

Figura 4

Boxplot Distribución del diámetro de la corona radiada



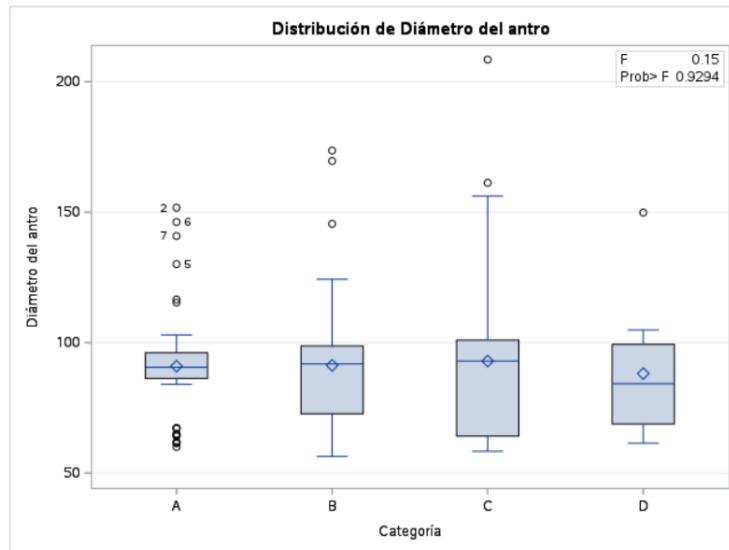
Nota: Fuente Propia. (Distribución realizada con datos obtenidos del análisis estadístico)

Guevara-Chacón et al. (2020) emplearon una clasificación A, B, C y D, donde los oocitos A y B mostraron mayor capacidad de maduración y fecundación, pudiendo incluso llegar a producir blastocitos. Los oocitos C y D, en cambio, presentaron una capacidad de maduración más limitada. Samaniego et al. (2017) utilizaron la técnica de Ovum Pick-up (OPU) para recuperar oocitos y llevaron a cabo una clasificación morfológica que incluyó las categorías A (oocitos compactos con más de 4 células del cúmulo y citoplasma uniforme), B (oocitos con 1 a 3 capas de células del cúmulo cubriendo la zona pelúcida y citoplasma opaco), C (oocitos completamente desnudos y/o citoplasma con zonas oscuras irregulares) y D (oocitos deformados con células de la

granulosa cubriendo parcial o totalmente la zona pelúcida, o completamente expandidos con cúmulo disperso y descolorido).

Figura 5

Boxplot Distribución del diámetro del antro



Nota: Fuente Propia. (Distribución realizada con datos obtenidos del análisis estadístico)

Fueron analizados los diferentes cambios en diámetros de la corona radial y el diámetro del antro, la corona radiada al cambiar la clasificación disminuye su tamaño considerablemente a diferencia del antro el cual se presenta de manera inversa, a mayor diámetro del antro, menor tamaño presenta el antro, además de esto, en esta clasificación se posee una mejor integridad del oocito, además de esto posibles cambios del antro cuando la corona radiada, puede estar relacionado con cambios osmóticos, cambios osmóticos, pérdida en la integridad de las células o maduración dinámica del oocito.

5 Conclusiones

Con la técnica de aspiración folicular se concluyo que existe un impacto sobre la capacidad de recolección de oocitos de acuerdo a la zona anatomía, siendo mayor la capacidad de recolección en ovarios derechos. La presencia de folículos menores a 4mm esta asociada a que gran parte del ciclo estral hay pequeñas ondas foliculares con folículos primarios.

Las variables de diámetro del antro, área del antro y longitud de la zona pelucida no se pueden clasificar acorde a criterios cualitativos en las categorías de A,B,C y D, asi mismo, esta variable es determinante para determinar la viabilidad del oocito.

Las variables de longitud y área de la corona radiana son tan amplias y diversas que se pueden agrupar en 3 categorías únicamente, dado que no existen diferencias significativas entre la categoría A y B. Estas variables estas asociadas a la cantidad de capas sobre puestas y la integridad de las mismas que clasificarlas en A, B, C y D, no son suficientes para determinar la calidad y funcionalidad del oocito.

6 Recomendaciones

Se recomienda seguir con nuevos estudios con la metodología de medición propuesta y avanzar en análisis futuros de respuesta a fertilidad dadas por las clasificaciones propuestas.

Es importante contar con datos de edades y grupos raciales para determinar los comportamientos biológicos y la variabilidad genética entre animales y así conocer su

De igual manera identificar las diferencias que existan entre la calidad de ovocitos tomando como variable la edad y el grupo racial, con el fin de eliminar la variabilidad individual y los efectos mixtos.

Referencias Bibliográficas

- agropecuaria, c., guía, d., & tractor, c. del. (2018). *Facultad De Medicina Veterinaria Y De Zootecnia*. <https://www.academia.edu/download/57039761/Tesis.pdf>
- Aldana, B., & Pinilla, L. (2021). *Reproductive Biotechnology Techniques for Obtaining Bovine Embryos*. 1–22.
- Alfonso, V., & Muñoz, M. (2018). *Medicina Veterinaria y Zootecnia*.
- Ali, S. (2021). *Advances in Bovine Follicular Aspiration Technique*. November.
- Alvarado, J. U., Argudo, D. G., Iñiguez, U. G., Bueno, P. L., Méndez, M. S. A., Soria, M. P., Perea, F. P. G., & Galarza, D. A. L. (2020). Morphometric and functional analysis of bovine oocytes obtained from abattoir ovaries and by transvaginal follicle aspiration in creole cows of the Ecuadorian Andean highland. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(2), 1–10. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17838>
- Aragónés, P., Bermúdez, I., Ortiz, I., Sánchez, J., & Madrigal-Valverde, M. (2022). Aspectos relacionados con la fertilización in vitro (FIV) en bovinos, unarevisión bibliográfica. *Revista AgroInnovación En El Trópico Húmedo*, 3(1), 52–61. <https://doi.org/10.18860/rath.v3i1.6507>
- Benitez D Y, Lopez, Y. O., & Peña R. (n.d.). *Evaluación de la concentración efectiva de agua de coco para la conservación in vitro de ovocitos bovinos*.
- Boni, R. (2012). Origins and Effects of Oocyte Quality in Cattle. *Animal Reproduction*, 9(3), 333–340.
- Bucaramanga, C. de C. de. (2018). Actividad pecuaria Provincias de Santander. *Camara de Comercio de Bucaramanga*, 443.

- Bulgarelli, D. L., Vireque, A. A., Pitangui-Molina, C. P., Silva-De-Sá, M. F., & De Sá Rosa-E-Silva, A. C. J. (2017). Reduced competence of immature and mature oocytes vitrified by Cryotop method: Assessment by in vitro fertilization and parthenogenetic activation in a bovine model. *Zygote*, 25(2), 222–230. <https://doi.org/10.1017/S0967199416000381>
- Carazas, K. E. (2018). *Evaluación de dos medios para la maduración de ovocitos in vitro en ganado bovino (Bous taurus) en condiciones de altura*. 5(1), 1–108. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/20534/T-2638.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Caribe Panamá Venezuela Océano Pacífico Ecuador Brasil Perú. (2022). 2021.
- Castillo, J., & Mantilla, H. (2020). Evaluación de la calidad de ovocitos ovinos obtenidos mediante aspiración folicular empleando cuatro presiones de vacío. In *Business Law binus* (Vol. 7, Issue 2). <http://repository.radenintan.ac.id/11375/1/PERPUS-PUSAT.pdf%0Ahttp://business-law.binus.ac.id/2015/10/08/pariwisata-syariah/%0Ahttps://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results%0Ahttps://journal.uir.ac.id/index.php/kiat/article/view/8839>
- Characteristics, L., Severely, T., & Handicapped, V. (2006). 三嶋明香 *1 落合真紀子 *1 庄司信行 *3 *1. 2, 1235–1238.
- Con, E., Factor, E. L., Endotelial, D. E. C., Luis, E., Nicolás, A., Mariela, R., & S, Á. R. M. (2007). *Análisis por microscopía raman de los cambios en la zona pelúcida de ovocitos bovinos madurados*. 2007.
- Diccionario de la lengua española | Edición del Tricentenario | RAE - ASALE*. (n.d.). Retrieved July 25, 2023, from <https://dle.rae.es/>

ESTRELLA, C. A., SUCONOTA, A. G., & AYALA, L. E. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *Maskana*, 8(3), 101–103.

Filipiak, Y., & Larocca, C. (2016). *BOVINA Yael Filipiak y Clara Larocca. SEPTEMBER 2012.*

Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). *RevistaVET-Abr-Jun-Bielli.* 14–22.

FAOSTAT. (n.d.-a). Retrieved March 28, 2023, from <https://www.fao.org/faostat/es/#home>

Fernández Reyes, F., Hernández Pichardo, J. ., & Reyes Flores, M. del C. (2010). Maduración Y Fertilización. *Revista de Salud Animal*, 32(2), 78–83.

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

Gonzales, H. M., Scotto, C., Davalos, R., & Gonzales Figueroa, H. (2019). Reproductive biotechnology in wild animals. *Spermova*, 9(2), 69–82. <https://doi.org/10.18548/aspe/0007.09>

Held, E., Mertens, E. M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Salilew-Wondim, D., Besenfelder, U., Havlicek, V., Herrler, A., Tesfaye, D., Schellander, K., & Hölker, M. (2012). Zona pellucida birefringence correlates with developmental capacity of bovine oocytes classified by maturational environment, COC morphology and G6PDH activity. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(4), 568–579. <https://doi.org/10.1071/RD11112>

sistema de co-cultivo con células del cumulus oophorus mejora la calidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 31(3), e18181.

<https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18181>

IBERDROLA. (2020). *La evolución de la biotecnología en el último siglo*. 2020.

https://www.iberdrola.com/wcorp/gc/prod/es_ES/comunicacion/docs/Infografia_Evolucion_Biotecnologia.pdf

Inmunoglobulinas. (n.d.). Retrieved July 25, 2023, from

<https://www.biotest.com/es/es/pacientes/inmunoglobulinas.cfm>

Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. (n.d.). Retrieved March 28, 2023, from

<https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018>

La tecnología en el sector ganadero: principal aliado para la seguridad alimentaria –

Economista Colombia. (n.d.). Retrieved March 28, 2023, from

<https://economistacolombia.com/empresarial/la-tecnologia-en-el-sector-ganadero-principal-aliado-para-la-seguridad-alimentaria/>

Lorenzo, M., Tello, M., Fischman, M., Claver, J., & Lombardo, D. (2015). Comparación de dos técnicas para la obtención de complejos cumulus ovocito porcinos. *InVet*, 17(1), 25–34.

M Grisales¹; J, Gómez; J, E., cheverry, & López. (2010). *Relación entre calidad de ovocitos y raza de la donadora en un programa de fertilización in vitro en una ganadería de Marsella Risaralda*.

Méndez, M. S., Argudo, D. E., Soria, M. E., Galarza, L. R., & Perea, F. P. (2020). Effect of the addition of melatonin in the oocyte maturation and/or vitrification medium on in vitro

production of bovine embryos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(1), 1–9. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i1.17557>

Martínez, Y. (2013). Análisis De La Morfología Ovocitaria En Bovina Previa a Fecundación in Vitro. *Trabajo Final De Máster. Universidad de Oviedo, España.*, 36. http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM_Yaiza_Martinez.pdf

Microscopio - Concepto, invención, tipos y partes. (n.d.). Retrieved July 24, 2023, from <https://concepto.de/microscopio/>

Mukrimaa, S. S., Nurdyansyah, Fahyuni, E. F., YULIA CITRA, A., Schulz, N. D., غسان, د., Taniredja, T., Faridli, E. M., & Harmianto, S. (2016). Embriología clinica y biología de la reproducción. *Jurnal Penelitian Pendidikan Guru Sekolah Dasar*, 6(August), 128.

Narváez, J., Piedra, E., Chacho, M., Jiménez, A., Landi, B., Cabrera, C., Guzmán, G., Suquitana, J., Amay, L., Ríos, N., Argudo, D., & Perea, F. (2019). Características morfológicas y foliculares de ovarios bovinos con o sin un cuerpo lúteo. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.

Neira-Rivera, E., Velásquez-Penagos, J. G., Cardozo-Cerquera, J. A., Velásquez-Penagos, J. H., Gutiérrez-Parrado, S. L., & Herrera-León, R. F. (2022). Morfometría de ovarios, folículos y su relación con la calidad oocitaria en bovinos. *Agronomía Mesoamericana*, 50156. <https://doi.org/10.15517/am.v34i1.50156>

Of, J., & Graphics, E. (2010). 周伟1, 田红旗1, 高广军2 (1.

Ortega, M. del C. (2016). *Comparación de dos métodos de recolección (Slicing y Aspiración Folicular) de ovocitos bovinos obtenidos post mortem para la producción de embriones in vitro.*

- Oses, M. V., Teruel, M. T., & Cabodevila, J. A. (2009). Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *Revista Veterinaria*, 20(2), 138–145. <https://doi.org/10.30972/vet.2021867>
- Palma, G. A. (2000). *Estructura Y Función De La Zona Pelucida*. 295–300.
- Palma, G.A; Gottfried, B. (1997). Biotecnología de la reproducción: ciencia, tecnología y sociedad. *Biotecnología de La Reproducción*, 1–19.
- P. G., & Galarza, D. A. L. (2020). Morphometric and functional analysis of bovine oocytes obtained from abattoir ovaries and by transvaginal follicle aspiration in creole cows of the Ecuadorian Andean highland. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(2), 1–10. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17838>
- Prentice, J. R., Singh, J., Dochi, O., & Anzar, M. (2011). Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology*, 75(4), 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.027>
- Pruebas de fagocitosis - Estudio de los leucocitos - C. Hemograma y otras pruebas de laboratorio - Enfermedades hematológicas - Medicina Interna Basada en la Evidencia.* (n.d.). Retrieved July 25, 2023, from <https://empendium.com/manualmibe/tratado/chapter/B76.VI.C.3.3>.
- Puerto-rodríguez, L. F. (2019). *Semen Sexado en Ganado Bovino Sexed Semen in Cattle*. 1–9.
- Quispe, E., Edith Ancco, G., Juan Solano, A., Ide Unchupaico, P., & Edwin Mellisho, S. (2018). Embryonic development capacity of bovine oocytes aspired by ovum pick-up and from slaughterhouse ovaries. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(4), 1114–1121. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14418>

- Quintana, M. D., Campos, P. E. C., Herrera, P., Gallego, C., & Padrón, E. (2012). Caracterización morfológica de ovocitos de *Bubalus bubalis* en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 34(2), 131–133. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2012000200012&lang=pt%5Cnhttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0253-570X2012000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- RAMOS, S. R. T. (2017). *PRESENCIA DE ALTERACIONES SEMINALES Y FACTORES DE RIESGO*.
- Riquelme, A. S., & De Los Reyes Solovera, M. (2004). Zona pellucida: An extracellular matrix with applications in the study of immunocontraception in domestic carnivores. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 14(5), 444–450.
- Rodríguez Zamora, L. A. (2013). Optimización del método de recuperación de ovocitos para la fecundación in vitro. *Universidad de Santiago de Compostela*, 157. <http://hdl.handle.net/10347/9213>
- Rodríguez, M., Vallejo, A., Batista, P., & Espasandin, A. C. (2011). Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejoragenética animal. *Cangué*, 31, 44–50. http://www.eemac.edu.uy/cangué/joomdocs/cangué031_rodriguez.pdf
- Sakine Ülküm Çözmeç, 1, Dursun Ali Dınc, 2 Mustafa Numan Bucak, 1 Muhammed Furkan Çiftçi, 1 Ömer Faruk, Yeşilkaya, 2, Vahit Ağır, 2, Ayşe Sari, 1, & Çay, M. G. and 2 H. A. (2021). Evaluation of Blastocyst Rates of Immature Bovine Oocytes Collected by Ovum Pick up (OPU) and Slaughterhouse 1 Evaluation of Blastocyst Rates of Immature

- Bovine Oocytes Collected by Ovum Pick up (OPU) and Slaughterhouse. *Veterinary Research*, 14(3), 27–33.
- Salinas, C. A. S. (2016). *Evaluación de la viabilidad de ovocitos colectados por aspiración en vacas post mórtem en altura*. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/9258/T-2276.pdf?sequence=1>
- Sirard, M. (2014). *El folículo ovárico de la vaca como modelo humano*.
- Somfai, T., & Hirao, Y. (2021). Vitrification of immature bovine oocytes in protein-free media: The impact of the cryoprotectant treatment protocol, base medium, and ovary storage. *Theriogenology*, 172, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.05.029>
- Samaniego, Ayala G., L., Jorge, Nieto E., P., Rodas C., R., Dutan S., J., Calle Or., G., Murillo A., Y., Vazquez M., J., Argudo G., D., & Perea G., F. (2017). Competencia del ovocito bovino obtenido por ovum pick-up valorado mediante el azul brillante de cresilo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 552–558.
- Salinas, C. A. S. (2016). *Evaluación de la viabilidad de ovocitos colectados por aspiración en vacas post mórtem en altura*. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/9258/T-2276.pdf?sequence=1>
- Tarazona, A., López, A., & Olivera-Angel, M. (2010). La competencia del ovocito: Qué, cómo y cuándo. *Acta Biologica Colombiana*, 15(3), 3–18.
- Tharasanit, T., & Thuwanut, P. (2021). Oocyte cryopreservation in domestic animals and humans: Principles, techniques and updated outcomes. *Animals*, 11(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ani11102949>

Transferencia embrionaria en blastocito - / Clínica de reproducción asistida. (n.d.). Retrieved July 24, 2023, from <https://aisafiv.com/es/fecundacion-in-vitro/transferencia-embrionaria-blastocito/>

Tinco-Salcedo, J., Quispe-Gutiérrez, U., & Zea-Gonzales, D. (2021). Asociación entre calidad de ovocitos recuperados y condición corporal en vacas criollas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 23(3), 133–138. <https://doi.org/10.18271/ria.2021.294>

Udalge, R. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1), 33–34.

Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>

Vargas, J. G., Jorge, W. R., Pachorro, F. A., Marín, Y. G., Martín, M. M., Alor, M. S., Falcón, J. M., Zevallos, O. B., Zegarra, J. D., & Fuster, M. R. (2021). Effect of two fertilization medium on the in vitro development of Creole bovine embryos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(5), 1–9. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.18709>

Vásquez - Cano, J., & Olivera - A, M. (2010). Señalización Celular en el Folículo Antral Bovino. *Orinoquia*, 14(2), 178–187.

Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal*

Reproduction Science, 246(December 2021), 1–18.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>

Zhou, G. Bin, & Li, N. (2013). Bovine Oocytes Cryoinjury and How to Improve Their Development Following Cryopreservation. *Animal Biotechnology*, 24(2), 94–106.

<https://doi.org/10.1080/10495398.2012.755466>