

**Universidad Nacional**  
**Facultad de Ciencias de la Salud**  
**Escuela de Medicina Veterinaria**

**Pasantía en reproducción asistida en ganado de leche en la  
empresa “*Phönix Repro, GmbH*”, Brandenburg, Alemania**

**Modalidad: Pasantía**

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado  
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

**Tatiana Jiménez Roa**

**Campus Presbítero Benjamín Núñez**

**2024**

## CARTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Laura Bouza Mora, M.Sc.

Vicedecana, Facultad de Ciencias de la Salud

---

Julia Rodríguez Barahona, Ph. D.

Subdirectora de la Escuela de Medicina

Veterinaria

---

Laura Castro Ramírez, Ph. D.

Tutora

---

Leslie Antonio González Grajales, Ph. D.

Lector

---

Rafael Ángel Vindas Bolaños, Ph.D.

Lector

---

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia, mi mamá, mi papá y mi hermano, por el apoyo incondicional a través de mis estudios y motivarme siempre a dar lo mejor de mí.

A el Dr. L. Antonio González Grajales y el equipo de Phönix Repro, por abrirme las puertas de su laboratorio y estar abiertos a enseñar, capacitar e inspirar a una joven veterinaria en este campo de trabajo.

A la Escuela de Medicina Veterinaria, sus profesores y personal administrativo, por el apoyo y enseñanzas en estos años. En especial a la Dra. Laura Castro Ramírez por su apoyo en la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros y amigos que hice durante la carrera, por las experiencias y momentos compartidos tanto en lo académico como lo social.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CARTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....</b>	<b><i>i</i></b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b><i>ii</i></b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b><i>iii</i></b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b><i>v</i></b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b><i>vi</i></b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b><i>vii</i></b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b><i>viii</i></b>
<b>PALABRAS CLAVES:.....</b>	<b><i>ix</i></b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b><i>1</i></b>
<b>1.1. Antecedentes.....</b>	<b><i>1</i></b>
<b>1.2. Justificación.....</b>	<b><i>8</i></b>
<b>1.3. Objetivos.....</b>	<b><i>9</i></b>
<b>1.3.1. Objetivo General.....</b>	<b><i>9</i></b>
<b>1.3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b><i>9</i></b>
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b><i>10</i></b>
<b>2.1. Lugar de estudio y horario.....</b>	<b><i>10</i></b>
<b>2.2. Distribución de las actividades durante la pasantía.....</b>	<b><i>11</i></b>
<b>2.3. Producción de embriones in vitro (PIV).....</b>	<b><i>12</i></b>
<b>2.3.1. Recuperación de complejos cúmulo-ovocito (COCs).....</b>	<b><i>13</i></b>
<b>2.3.2. Determinación de la calidad de los COCs.....</b>	<b><i>15</i></b>
<b>2.3.3. Maduración in vitro (MIV).....</b>	<b><i>16</i></b>
<b>2.3.4. Fertilización in vitro (FIV).....</b>	<b><i>17</i></b>
<b>2.3.5. Cultivo in vitro (CIV).....</b>	<b><i>19</i></b>
<b>2.4. Producción de embriones in vivo.....</b>	<b><i>20</i></b>
<b>2.5. Evaluación y clasificación de los embriones bovinos.....</b>	<b><i>22</i></b>
<b>2.6. Criopreservación de embriones producidos in vivo e in vitro.....</b>	<b><i>25</i></b>
<b>2.7. Transferencia de embriones: en fresco y crio-preservados.....</b>	<b><i>26</i></b>
<b>2.8. Otras actividades realizadas.....</b>	<b><i>28</i></b>
<b>2.8.1. Ecografía del tracto reproductivo femenino.....</b>	<b><i>28</i></b>
<b>2.8.2. Visitas a la estación de colecta de semen RBB.....</b>	<b><i>29</i></b>

<b>2.8.3. Curso de IA.....</b>	<b>30</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Producción de embriones in vitro.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.1. Recuperación de ovocitos.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2. Determinación de la calidad de COCs.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1.3. Maduración In vitro (MIV).....</b>	<b>35</b>
<b>3.1.4. Fertilización In-vitro (FIV).....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.5. Cultivo In-vitro (CIV).....</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Producción de embriones in vivo.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3. Criopreservación de los embriones producidos in vivo e in vitro.....</b>	<b>47</b>
<b>3.4. Transferencia de embriones: en fresco y criopreservados.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5. Otras actividades realizadas.....</b>	<b>52</b>
<b>3.5.1. Ecografía del tracto reproductivo femenino.....</b>	<b>52</b>
<b>3.5.2. Estación de colecta de semen RBB.....</b>	<b>53</b>
<b>3.5.3. Curso de IA.....</b>	<b>54</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1. Actividades realizadas durante la pasantía en Phönix Repro. ....</b>	<b>12</b>
<b>Cuadro 2. Clasificación y criterios de calidad de los COC (Marc et al. 2014). ....</b>	<b>16</b>
<b>Cuadro 3. Criterios de clasificación según estado de desarrollo del embrión (Bo y Mapletoft 2013) .....</b>	<b>23</b>
<b>Cuadro 4. Clasificación según calidad del embrión (Bo y Mapletoft 2013). ....</b>	<b>24</b>
<b>Cuadro 5. Distribución de la participación en OPU por mes. ....</b>	<b>33</b>
<b>Cuadro 6. Clasificación según estado y calidad de los embriones producidos por la pasante. .</b>	<b>44</b>
<b>Cuadro 7. Representación de los resultados obtenidos a partir de la producción de embriones in vivo en las que la pasante tuvo participación. ....</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pajillas para criopreservación de embriones. ....	<b>26</b>
<b>Figura 2.</b> Distribución de la cantidad de ovarios procesados con el método de rayado al ovario <i>ex vivo</i> y la cantidad de COCs recuperados en cada ronda de PIV .....	<b>32</b>
<b>Figura 3.</b> Clasificación por calidad de los COC recuperados por la pasante en las rondas de producción de embriones in vitro, antes de MIV.....	<b>34</b>
<b>Figura 4.</b> Selección de COC´s viables para continuar a FIV dentro de las rondas de producción de embriones de la pasante. ....	<b>36</b>
<b>Figura 5.</b> Datos obtenidos a partir del procesamiento del semen para FIV: motilidad post-descongelación y concentración seminal. ....	<b>38</b>
<b>Figura 6.</b> Resultados de la revisión de división celular en el día 1 (24 horas) de CIV, se muestra la cantidad de embriones colocados en CIV, la cantidad de embriones divididos y el porcentaje de división. ....	<b>41</b>
<b>Figura 7.</b> Resultados de las rondas de producción de embriones in vitro realizados por la pasante: cantidad de estructuras colocadas en CIV, cantidad de estructuras embrionarias con división celular, cantidad de embriones obtenidos y porcentajes de producción. ....	<b>45</b>
<b>Figura 8.</b> Embriones post-descongelación e incubación: viables y con reinicio de desarrollo embrionario. ....	<b>51</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CCPEs – Terminaciones de procesos de las células del cúmulo

CCs – Células del cúmulo

CIV – Cultivo *In Vitro*

CL – Cuerpo lúteo

COCs – Complejos cúmulos-ovocito

FIV – Fertilización *In Vitro*

FSH – Hormona folículo estimulante

GnRH – Hormona liberadora de gonadotropina

IA – Inseminación Artificial

IATF – Inseminación Artificial a Tiempo Fijo

LH – Hormona luteinizante

MIV – Maduración *In Vitro*

OPU – Ovum Pick Up

PBS – Buffer fosfato salino

PG - Progesterona

PGF – Prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$

PIV – Producción *In Vitro*

SFO – Sintético de fluido del oviducto

TE – Transferencia de Embriones

TETF – Transferencia de Embriones a Tiempo Fijo

US – Ultrasonido

## RESUMEN

Se realizó una pasantía con el fin de desarrollar destreza en técnicas de reproducción asistida en ganado lechero en la empresa dedicada a esta área en bovinos “Phönix Repro, GmbH”, ubicada en Brandenburg, Bernau bei Berlin, Alemania. Durante un lapso de 17 semanas, entre el 6 de marzo y el 30 de junio de 2023, se trabajó un total aproximado de 502 horas bajo la supervisión del Dr. L Antonio González Grajales. El énfasis de la empresa es la producción de embriones *in vitro*, por lo que se obtuvo experiencia en la colecta de complejos cúmulos-ovocito (COCs) de ovarios *ex vivo* (n=167) por el método de rayado de los ovarios, maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos colectados de buena calidad (n=115), preparación de semen bovino (n=7), fertilización *in vitro* (FIV) (n=107), cultivo *in vitro* (CIV) (n=101), clasificación de embriones, y criopreservación de gametos y embriones (n=8). Adicionalmente, se participó en trabajo de campo asociado con procedimientos de Ovum Pick Up (OPU) (n=51), superovulación y producción de embriones *in vivo* (n=8), transferencia de embriones (TE) (n=13), selección de receptoras (n=17), ecografía de tracto reproductivo (n=149), e inseminación artificial (IA) (n=37).

Durante este periodo, se tuvo la oportunidad de participar activamente en técnicas de reproducción asistida en ganado lechero, por lo que pudo desarrollar destrezas y adquirir experiencia teórico-práctica en procedimientos de biotecnología reproductiva bovina de alto impacto en el mejoramiento genético y la productividad de los hatos. Lo anterior es de suma importancia dada la creciente demanda y necesidad de aumentar la producción de alimentos de origen animal a nivel nacional y mundial.

**PALABRAS CLAVES:**

Embrión, producción *in vitro*, biotecnología de la reproducción, transferencia de embriones.

## ABSTRACT

An externship was carried out to develop skills in assisted reproduction techniques in dairy cattle at the company dedicated to this field “Phönix Repro, GmbH”, located in Brandenburg, Bernau bei Berlin, Germany. During a period of 17 weeks, between March 6<sup>th</sup> and June 30<sup>th</sup>, 2023, the extern completed approximately 502 working hours under the supervision of Dr. L. Antonio González Grajales. The company specializes in embryo *in vitro* production (IVP). The extern gained experience in cumulus oocyte complexes (COCs) *ex vivo* retrieval by the slicing method (n=167), *in vitro* maturation (IVM) of high-quality oocytes (n=115), bovine semen preparation (n=7), *in vitro* fertilization (IVF) (n=107), *in vitro* culture (IVC) (n=101), evaluation and classification of bovine embryos, embryo and gametes cryopreservation (n=8). Additionally, field work associated to Ovum Pick Up (OPU) (n=51), superovulation and *in vivo* embryo production (n=8), embryo transfer (ET) (n=13), recipient selection (n=17), reproductive tract ultrasonography (n=149) and artificial insemination (AI) (n=37) was performed.

During this externship, there was an opportunity to actively participate in assisted reproductive techniques in dairy cattle, gaining theoretical and practical experience in these procedures, which have a high impact in genetic improvement and herd productivity. This is of utmost importance due to the growing demand and the need to increase production of animal origin goods at national and international level.

## KEYWORDS

Embryo, *in vitro* production, reproduction biotechnologies, embryo transfer.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La demanda de carne, leche y sus derivados para la creciente población mundial ha generado una gran necesidad de llevar a cabo un amplio desarrollo de tecnologías innovadoras con el fin de aumentar la producción bovina. En consecuencia, la producción de leche bovina se ha convertido en una industria compleja que depende de muchos factores para asegurar su productividad y rentabilidad, tales como: genética, nutrición, salud general, reproducción, manejo ambiental y productivo (Klopfenstein 2021).

La reproducción bovina está directamente relacionada con la producción láctea, por lo que con un nivel adecuado de fertilidad en el hato se logra una mayor producción y por lo tanto, una mayor rentabilidad (Bello 2012). En los inicios de la explotación de ganado lechero en 4000 A.C., la reproducción en forma natural fue la única técnica utilizada (McGuffey y Shirley 2011). Sin embargo, en el último siglo que se dieron importantes avances en distintas áreas, tales como: fisiología y endocrinología reproductiva y genética, con el fin de mejorar la capacidad reproductiva de las vacas, dando paso a tecnologías de reproducción asistida (Moore y Thatcher 2006).

La técnica de reproducción asistida más antigua es la inseminación artificial (IA) (Kasimanickam 2021a). La primera IA con semen fresco se realizó en Estados Unidos en 1938 (McGuffey y Shirley 2011). El procedimiento consiste en la implantación artificial del semen colectado previamente dentro del tracto reproductivo femenino con el objetivo de alcanzar la fertilización del óvulo (Webb 1992). Con la introducción de esta técnica se logró ampliar la cantidad de hembras que podían ser inseminadas y

fecundadas con machos de calidad superior, resultando en una importante diseminación del material genético proveniente del macho (Parkinson y Morell 2019).

Inicialmente, la IA se realizaba únicamente con semen fresco, pero en la década de 1950, con la necesidad de la implementación de la técnica en fincas alrededor del mundo, se desarrollaron metodologías que permitieron el almacenamiento de semen a largo plazo por medio de la criopreservación (Sathe 2021). En consecuencia, se han diseminado exponencialmente genes deseables del macho a gran escala y por consiguiente, se ha acelerado de manera significativa el mejoramiento genético en bovinos (Ugur et al. 2019).

La criopreservación consiste en la preservación de muestras biológicas; tales como proteínas, células somáticas o reproductivas, y tejidos. Con ello se busca mantener la viabilidad de las muestras a baja temperatura, por tiempo prolongado e indefinido, dado que se suprime la tasa metabólica celular al detener el metabolismo catabólico (Upadhyay et.al 2021; Niemann y Wrenzycki 2018). Sin embargo, los cambios de temperatura durante los procesos de congelamiento y descongelamiento pueden generar crio-lesiones en las células debido a la formación de cristales a nivel intra y extracelular; así como por la inducción de estrés osmótico, oxidativo y de nitración, resultando en alteraciones estructurales y fisiológicas que disminuyen la viabilidad de los gametos y células post descongelamiento (Parkinson y Morell 2019; Upadhyay et al. 2021).

Para contrarrestar estos daños en los espermatozoides, actualmente se utilizan diluyentes y crioprotectores. Los primeros favorecen la conservación de la motilidad y fertilidad del semen al proveer sustratos energéticos, actuar como amortiguadores y

mantener la presión osmótica y la concentración de electrolitos. Adicionalmente, los crioprotectores que se agregan a los diluyentes se encargan de reducir el estrés físico y químico causado por el enfriamiento, congelación y descongelación (Sathe 2021; Upadhyay et al. 2021).

A pesar de la utilización de crioprotectores, una gran cantidad de gametos no sobreviven al estrés que implican los procesos de congelación y descongelación. Para contrarrestar estos efectos negativos, se recomienda utilizar solamente semen con excelente viabilidad y morfología previo al congelamiento. Se han desarrollado diversos protocolos utilizando diferentes tipos de diluyentes y de crioprotectores, que incluyen: amortiguadores de pH, crioprotectores impermeables (yema de huevo), crioprotectores permeables (glicerol), fuentes energéticas y aditivos (antibióticos, antioxidantes y vitaminas). Actualmente se utilizan técnicas de criopreservación que incluyen el congelamiento convencional o automatizado y la vitrificación (Sathe 2021; Yanéz-Ortiz et al. 2021).

Aunado a lo anterior, a partir de la aparición de IA, se evidenció la necesidad de mejorar la detección del estro, dado que la dificultad en su detección incide en la eficiencia reproductiva y puede implicar pérdidas económicas significativas para el productor. Así, la falla en detección de celos ya sea por inadecuada observación por error humano o por uso inapropiado de las herramientas de detección, puede llegar a afectar negativamente las tasas de preñez (Palomares 2021). También puede haber otros factores asociados como: condiciones climáticas extremas, estrés, pobres condiciones de alojamiento de las vacas, producción láctea y estado endocrino. De

este modo, una parte esencial en todo programa de IA es contar con un sistema exitoso de detección de celos (Palomares 2021).

Uno de los métodos más básicos para determinar el momento ideal para realizar la IA se basa en la observación del hato durante la mañana y en la tarde para detectar signos específicos de celo como por ejemplo aquellas hembras que se dejan montar por otras. Para facilitar esta tarea, se han creado herramientas, así como parches, marcadores en la base de la cola y toros marcadores (Miciakova et al. 2018). Actualmente, también se utilizan métodos más sofisticados como sistemas electrónicos automatizados de monitoreo de la actividad física, detectores de monta en celo (sensores de presión) y acelerómetros (Madkar et al. 2021).

Desde la década de 1960 los protocolos de sincronización del estro han estado disponibles para la industria lechera bovina (Xu 2011). Sus ventajas incluyen eliminar la necesidad de detectar el celo por operadores y por consiguiente, evitar el posible error humano y concentrar procesos como IA o partos en periodos cortos. Sin embargo, la detección de celos sigue siendo la principal herramienta en fincas que no tienen acceso a ese tipo de técnicas avanzadas de reproducción asistida (Palomares 2021).

Los protocolos de sincronización de celos tienen como propósito inducir una respuesta de celo y ovulación en un intervalo específico, lo que conlleva beneficios al sistema productivo tales como: reducción del periodo de observación del estro con una mejora en su detección, el acortamiento del intervalo entre partos, aumento en la eficacia de la IA, incremento del porcentaje de vacas inseminadas en un periodo

definido y el manejo de grupos en etapas productivas similares, ya sea en gestación o lactancia (Xu 2011; Dyer y Graves 2017).

Diferentes protocolos de sincronización de celos han sido desarrollados con el uso de prostaglandinas, progestágenos, así como combinaciones de gonadotropinas con prostaglandinas (Salverson y Perry 2020). Además de la inducción del celo, la sincronización de la ovulación permite realizar la inseminación en un tiempo determinado sin necesidad de detectar el estro, mejor conocida como Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF), la cual facilita enormemente el manejo de los hatos. Actualmente existen múltiples protocolos de sincronización e IATF. Estos incluyen primero la administración de gonadotropinas tales como la coriónica equina (eCG) que favorecen el desarrollo folicular. Segundo, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual induce la ovulación del folículo dominante (Colazo y Mapletoft 2014; Kasimanickam 2021b).

Otra técnica de reproducción asistida que ha sido implementada exitosamente desde su primer reporte es la transferencia de embriones (TE). Inicialmente, el proceso se realizaba por medio de fertilización *in vivo*, donde se inseminaba artificialmente a la vaca y luego se recuperaba el embrión por medio de cirugía. Seguidamente, el embrión se transfería a una vaca receptora de forma quirúrgica. Sin embargo, en ese momento se consideró que era un proceso difícil de implementar por la complejidad de la técnica y los elevados costos del proceso, ya que implicaba la realización de laparoscopia (Salgado-Cruz y Lopera-Vásquezl 2020).

Posteriormente, durante el periodo comprendido entre 1960 y 1970, se desarrolló la técnica de TE por vía transvaginal, sin la necesidad de realizar cirugía,

convirtiéndose en una técnica más práctica y accesible para los productores. A partir de este momento, la industria de la transferencia de embriones se estableció, aumentando el interés no sólo por parte de los productores sino también con propósitos investigativos (Callesen et al 2019; Noga y Looney 2021).

La TE tiene la gran ventaja de permitir una reproducción más eficaz de las hembras con alto rendimiento. En consecuencia, la combinación de IA (diseminación de material genético de machos de alta calidad genética) con TE (propagación de material genético de hembras de calidad superior), permitió potenciar el mejoramiento genético de los hatos, ayudando a acortar el intervalo generacional y realizar una selección artificial más intensa (Bertolini y Bertolini 2009; Nowicki 2021).

Con la necesidad de preservar los embriones de alto valor genético, las técnicas de criopreservación fueron utilizadas para embriones. En 1973, nació el primer ternero producto de un embrión criopreservado. Desde entonces se han llevado a cabo una serie de investigaciones orientadas a desarrollar técnicas más avanzadas tales como la producción de embriones *in vitro*, la micromanipulación de embriones, sexado embrionario, manipulación genética, entre otras (Noga y Looney 2021).

En 1978, nació el primer ternero producto de fertilización *in vitro* (FIV). Seguidamente en los años 80, esta técnica creció exponencialmente y abrió paso además a nuevas investigaciones con metodologías similares (Van Wagtendonk-de Leeuw 2006). El término FIV implica producir los embriones en un ambiente artificial controlado, donde se favorece la maduración e interacción de los gametos de ambos sexos, con el objetivo de producir fertilización del óvulo y su subsecuente desarrollo *in vitro* (Filipiak y Larroca 2012). La FIV se considera una de las técnicas de reproducción

asistida más exitosas, que se puede utilizar con fines de investigación, mejoramiento genético, desarrollo de nuevas técnicas de reproducción asistida y con fines comerciales (Salgado-Cruz y Lopera-Vásquez 2020).

El proceso de producción inicia con la colecta del gameto femenino. Actualmente, la técnica más utilizada para recuperar óvulos y producir embriones *in vitro* es la “*Ovum Pick-Up*” (OPU), la cual permite colectar óvulos inmaduros de una hembra viva genéticamente superior por medio de aspiración transvaginal guiada por ultrasonido. Seguidamente estos ovocitos son madurados y fertilizados *in vitro* (Van Wagendonk-de Leeuw 2006). Esta técnica tiene la gran ventaja de que permite gran repetibilidad del procedimiento en un mismo individuo y, por ende, es factible continuar obteniendo embriones de hembras superiores (Galli et al 2001).

Cabe destacar que la ultrasonografía (US) transrectal ha sido clave en el desarrollo del campo de la reproducción bovina, cuyo desarrollo se dio a partir de la década de los años 80. Desde entonces la US ha permitido un mejor entendimiento sobre la estructura y función del aparato reproductivo de la vaca (Adams y Singh 2011). La US tiene aplicaciones prácticas tales como: detección de preñez desde tempranas etapas de la gestación, seguimiento del estado de la preñez, valoración del desarrollo y viabilidad de los embriones/fetos, detección de patologías uterinas y ováricas, determinación del sexo fetal, evaluación de estructuras ováricas, entre otras. El uso de US en vacas destinadas a la producción láctea es especialmente útil debido a la posibilidad de realizar diagnóstico de preñez temprano, con la consecuente determinación de las vacas vacías que deben ser reintroducidas lo antes posible en un programa de IA (Fricke 2002).

## 1.2. Justificación

En Costa Rica, las actividades agropecuarias tienen un alto impacto en el ámbito socioeconómico (Viguera et al 2018). Esto incluye la ganadería bovina, la cual se estima en 1,4 millones de cabezas de ganado, con un 14,5 % corresponde a ganado de leche (INEC 2021). Como es bien sabido, la reproducción tiene una innegable asociación con la productividad de las fincas lecheras, y de aquí la importancia de la utilización de las técnicas de reproducción asistida para mejorar la eficiencia de los hatos.

A nivel nacional, la monta natural sigue siendo el principal método de reproducción utilizado (Vásquez-Loaiza y Molina-Coto 2021). No obstante, en las fincas lecheras la IA ha ido desplazando la monta natural de manera importante aunque, siempre existe resistencia por parte de algunos pequeños productores al considerar que obtienen un mejor rendimiento reproductivo con monta natural sin la necesidad de detectar el celo (Lima et al 2009).

Sin embargo, con el crecimiento del sector agropecuario nacional máxime ante las demandas de leche que surgen a raíz de los diferentes tratados comerciales de nuestro país con el resto del mundo, es indispensable contar con producciones bovinas más eficientes y sostenibles (MAG 2007). Una de las opciones para lograr este objetivo es la implementación de técnicas de reproducción asistida eficaces en el país. Por lo tanto, es importante generar conocimiento y capacitación de futuros y actuales médicos veterinarios en esta área para fomentar su uso en Costa Rica, ya que son poco conocidas y utilizadas en el país.

La industria lechera alemana está altamente desarrollada y especializada a través de la implementación de técnicas de reproducción asistida, por lo que la realización de una pasantía en este país consistió en un escenario sumamente enriquecedor para proveer capacitación y comprensión en el área.

Sumado a lo anterior, la aplicación de las técnicas abordadas permitiría beneficiar la industria ganadera debido a su impacto económico, así como a los futuros profesionales en medicina veterinaria de nuestro país. Todo lo anterior, considerando que actualmente muy pocos profesionales están ofreciendo el servicio y la necesidad de implementar a mayor escala tecnologías reproductivas es enorme.

### **1.3. Objetivos**

#### *1.3.1. Objetivo General*

Desarrollar destreza en técnicas de reproducción asistida en ganado lechero con el fin de poder contribuir en el mejoramiento de su eficiencia reproductiva.

#### *1.3.2. Objetivos Específicos*

- 1.3.2.1. Desarrollar destrezas en técnicas de colecta de óvulos y producción de embriones *in vitro*.
- 1.3.2.2. Asistir en la realización de las técnicas de producción y colecta de embriones *in vivo*, transferencia y criopreservación de embriones y gametos.
- 1.3.2.3. Entrenarse en programas de IA, ultrasonografía del tracto reproductivo femenino y protocolos hormonales de sincronización de celo, superovulación y estimulación de folículos.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Lugar de estudio y horario

Este Trabajo Final de Graduación fue realizado en modalidad de pasantía en la empresa de reproducción “Phönix Repro, GmbH”, cuyo laboratorio está ubicado en Bernauer Allee 10, 16321, Bernau bei Berlin, Brandenburg, Alemania. Adicionalmente, cuenta con la estación de donadoras de óvulos de alto valor genético, “*Rinder-Produktion Berlin Brandenburg (RBB)*”, ubicada en Bahnhofstrasse 17<sup>a</sup>, 16818 Dabergotz, Brandenburg, Alemania. El trabajo fue supervisado por el Dr. Leslie Antonio González Grajales, quien labora en dicha entidad.

La empresa fue fundada y comenzó a brindar servicios en enero del 2021, con la misión de implementar biotecnologías reproductivas en ganadería bovina en múltiples regiones de Alemania. Asimismo, provee consultorías y servicios relacionados con las técnicas de reproducción asistida. La compañía se especializa en la producción de embriones *in vitro* e *in vivo*, incluyendo su respectiva criopreservación y transferencia.

La pasantía se extendió por cuatro meses, inició el 6 de marzo y concluyó el 30 de junio de 2023, con un total de 17 semanas de trabajo. Se manejó un horario de trabajo aproximado de 24-36 horas semanales distribuidas de lunes a viernes, variable dependiendo del flujo de casos. Se completaron 502 horas totales de trabajo las cuales fueron debidamente documentadas en una bitácora personal de trabajo revisada y firmada por el Dr. Antonio González y la Dra. Laura Castro. En este documento se detallan las actividades realizadas diariamente.

## 2.2. Distribución de las actividades durante la pasantía

El tiempo de la pasantía fue distribuido entre las distintas actividades programadas, con un mayor énfasis en el Laboratorio de FIV, participando en el proceso de producción de embriones comerciales y de plantas de cosecha de bovinos. Los embriones comerciales eran de vacas de alto valor genético de múltiples razas lecheras, principalmente Holstein, las cuales estaban alojadas en la estación de donadoras. Un grupo seleccionado de estas vacas era colectado semana de por medio. Los complejos cúmulo ovocito (COCs) recuperados eran procesados en el Laboratorio de FIV para producción *in vitro* (PIV) de embriones. Se participó por medio de observación y asistencia en cada una de las etapas de la PIV. Por otro lado, el laboratorio realizaba rondas rutinarias de PIV a partir de ovarios colectados de planta de cosecha. Esto con el fin de realizar un monitoreo y control de la producción del laboratorio. Se tuvo la oportunidad de participar de manera práctica e individual, bajo supervisión del Dr. González, en cinco de estas rondas de PIV.

De igual manera, la pasantía incluyó un componente de trabajo de campo en la estación de donadoras y fincas asociadas a la empresa, donde se participó de manera observacional, de asistencia y práctica. Estas instalaciones cuentan con una sala de inmovilización donde se ejecutan aspiraciones foliculares por OPU y lavados uterinos para recuperación de embriones *in vivo*. Se cuenta con un laboratorio adyacente donde se procesan los gametos y/o embriones obtenidos. Además, en los corrales, tanto de la estación de donadoras como de las fincas asociadas a la empresa, se realizan las evaluaciones reproductivas por medio de ultrasonografía, IA y transferencias de embriones.

Adicionalmente, se tuvo la oportunidad de participar en otras actividades. En la semana del 24 al 27 de abril, la pasante participó en un curso de IA impartido por “Instituto de Reproducción de Animales de Granja Schönow e.V.”, ubicado en el mismo edificio que el laboratorio Phönix Repro. Luego, en los días 22 al 25 de mayo, se realizaron visitas a la estación de colecta de semen “*Rinder-Produktion Berlin Brandenburg (RBB), Besamungsstation Schmergow*”, ubicada en Lehniner Strasse 9, 14550 Gross Kreutz (Havel), Brandenburg, Alemania. El detalle de las actividades realizadas durante la pasantía de acuerdo con las fechas se detalla en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Actividades realizadas durante la pasantía en Phönix Repro.

<b>Fecha</b>	<b>Actividades en las que se participó</b>
6 de marzo del 2023	Inicio de la pasantía.
7 de marzo del 2023	Inicio actividades asociadas a procedimientos laboratoriales de técnicas de reproducción asistida en laboratorio de fertilización <i>in vitro</i> .
13 de marzo del 2023	Inicio participación en actividades asociadas a procedimientos prácticos en estaciones de donadoras y fincas asociadas a la empresa.
21 de marzo del 2023	Inicio primera ronda de PIV de embriones por la pasante.
28 de marzo del 2023	Inicio segunda ronda de PIV de embriones por la pasante.
24 al 28 de abril 2023	Curso de IA
22 al 25 de mayo 2023	Visita a centro de colecta de semen RBB.
16 de mayo del 2023	Inicio tercera ronda de PIV de embriones por la pasante.
13 de junio del 2023	Inicio cuarta ronda de PIV de embriones por la pasante.
20 de junio del 2023	Inicio quinta ronda de PIV de embriones por la pasante.
30 de junio del 2023	Finalización de la pasantía

### **2.3. Producción de embriones *in vitro* (PIV)**

Se trabajó en el laboratorio de FIV de Phönix Repro, donde se realiza todo el procesamiento de los embriones *in vitro*. Este se encuentra debidamente equipado con

los instrumentos necesarios para PIV, entre estos: estereoscopios, placas térmicas, incubadoras, cámara de flujo laminar, centrifugas, microscopios y pipetas.

El proceso de PIV incluye los siguientes pasos: recuperación de complejos cúmulo-ovocito (COCs), maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV).

### 2.3.1. *Recuperación de complejos cúmulo-ovocito (COCs)*

El éxito en la producción de embriones *in vitro* es definido por la capacidad de obtener COCs de buena calidad provenientes ya sea de animales muertos (de planta de cosecha, eutanasia o muerte natural), o de animales vivos (vía OPU). La calidad de los COCs depende de varios factores: tamaño del folículo, etapa de la onda folicular, método de colecta y factores individuales de la donadora (ciclo estral, edad y condición corporal). La calidad de los COCs se asocia con su capacidad de alcanzar el estado de desarrollo de blastocisto (Niemann y Wrenzycki 2018).

#### 2.3.1.1 *Recuperación de COC de ovarios ex vivo*

En *animales post-mortem* se utilizan principalmente dos técnicas de recolección de ovocitos. La primera es por aspiración directa de los folículos presentes en ovarios *ex vivo* con una aguja acoplada a una jeringa o a un sistema de bomba de vacío, el líquido recuperado se deposita en un contenedor con medio de colecta, así como buffer fosfato salino (PBS). La segunda técnica, utilizada por la pasante, es por rayado del ovario. Consiste en la realización de múltiples cortes en ovarios *ex vivo* con bisturí o tijeras sobre una placa de Petri. El objetivo es cortar los folículos que se ubican en la corteza del ovario, con el fin de liberar la mayor cantidad de ovocitos (Gordon 2003). Luego se procede a lavar el ovario con medio PBS, con el fin de recuperar líquido

folicular y por ende los ovocitos en el líquido. La principal ventaja de realizar colecta post-mortem es que se observa el ovario *ex vivo*, lo que facilita la visualización y selección de folículos (Filipiak y Larocca 2012).

Se trabajó de manera individual con material obtenido de plantas de cosecha para las rondas de control del laboratorio para realizar sus propias rondas de PIV. Se utilizó el método descrito de rayado del ovario *ex vivo* para la recuperación de COCs.

### 2.3.1.2 Recuperación de COCs de ovarios *in vivo*

En la actualidad, para la recuperación *in vivo*, se utiliza mayoritariamente la técnica de Ovum Pick-Up (OPU). Este es un procedimiento mínimamente invasivo guiado por ultrasonido para la recuperación de COCs por medio de aspiración de folículos antrales *in vivo* (Qi et al 2013). El sistema tiene tres componentes: el ultrasonido transrectal con una sonda rígida, una bomba de aspiración y un sistema de guía para la aguja que está conectado a un recipiente de recolección para los COCs (Palma 2001).

Primero, se debe hacer una anestesia epidural para evitar movimientos durante el procedimiento y disminuir los movimientos peristálticos con lo que se facilita la manipulación transrectal. En caso de ser necesario se puede sedar el animal. Luego, se extraen las heces del recto y se limpia la vulva y perineo con una toalla para evitar contaminación de la vagina. Se procede a introducir la sonda rígida del US en la vagina que permite la visualización del ovario que está fijo contra la sonda por la mano del operador a través del recto. Esto permite la ubicación de los folículos con sus respectivos puntos de punción. Una vez ubicado, se introduce la aguja por el sistema

de la sonda rígida, se atraviesa la pared de la vagina y se penetra el folículo con la aguja guiado por US. Luego, se activa la bomba de vacío acoplada a la aguja por un tubo de silicón o teflón que transporta el contenido folicular hacia un recipiente, ya sea un filtro de embriones o un tubo sellado con tapón de silicón, que contiene medio de colecta de ovocitos. El sistema de colecta se encuentra en una placa térmica que mantiene la temperatura aproximada entre 38 y 39°C (Bols y Stout 2018).

El laboratorio recupera óvulos de hembras de alto valor genético, provenientes de diferentes puntos de Alemania. Ya sea que estén alojadas en la estación de donadoras o en fincas asociadas con la empresa donde se realiza el procedimiento.

La mayoría de las vacas colectadas durante la pasantía fueron estimuladas con Hormona Folículo Estimulante (FSH). Estos protocolos buscan aumentar el número de folículos, pero no el número de ovulaciones. Para esto hay diferentes guías según el producto, modificando la dosis y frecuencia de aplicación con respecto al tiempo de privación de FSH. Por ejemplo, se puede inyectar FSH intramuscular dos veces al día, por 2-3 días, dejando posteriormente un descanso de 40 horas. Por último, se procede a realizar la colecta de óvulos vía OPU el día 2 posterior a la última aplicación de FSH (Bols y Stout 2018, Morera-Jiménez et al 2022).

### *2.3.2. Determinación de la calidad de los COCs*

Posterior a la colecta realizada por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, se procesa el líquido obtenido de cada muestra. Primero, se traspasa la solución colectada a un filtro específico para colección de embriones y gametos, el cual permite el paso de líquido, pero no de los gametos o embriones. Siendo así, se

filtra el líquido colectado y luego se diluye el remanente con más medio de colecta, como el PBS, para luego filtrar nuevamente. Se repite hasta obtener un líquido claro que facilite la visualización y por ende, la posterior búsqueda y clasificación de los ovocitos en el estereoscopio (Niemann y Wrenzycki 2018).

Los óvulos colectados por la pasante durante las rondas de PIV a su cargo fueron evaluados y seleccionados utilizando la clasificación establecida en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Clasificación y criterios de calidad de los COC (Marc et al. 2014).

<b>Clasificación COC</b>	<b>Criterios</b>
Grado I: Buena calidad	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cúmulo compacto y no expandido.</li> <li>2. Mínimo de 5 capas de células del cúmulo.</li> <li>3. Ooplasma visible, denso y homogéneo.</li> </ol>
Grado II: Calidad Intermedia	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cúmulo compacto y grueso.</li> <li>2. De 2-4 capas de células del cúmulo, cubriendo toda la periferia de la zona pelúcida.</li> <li>3. Ooplasma denso y con granulación uniforme.</li> </ol>
Grado III: Calidad mala	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Células del cúmulo parcialmente denudadas.</li> <li>2. De 1-2 capas de células del cúmulo.</li> <li>3. Ooplasma irregular y/o contraído.</li> </ol>
Grado IV: No viables	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ovocito denudado.</li> <li>2. Sin células del cúmulo en ningún sector de la periferia de la zona pelúcida.</li> <li>3. Ooplasma irregular y contraído.</li> </ol>

### 2.3.3. Maduración *in vitro* (MIV)

Los ovocitos recuperados se colocaron en un medio MIV comercial, el cual era incubado por un lapso de 20-24 horas. Este medio facilita un ambiente ideal durante los procesos de maduración nuclear y citoplasmático; simulando el líquido folicular (Niemann y Wrenzycki 2018).

Pasado el tiempo de maduración, se evaluaban y reclasificaban los COCs para determinar los que son viables (grado I y II) para continuar el proceso de FIV, mientras que los grado III y IV se consideran no viables y eran descartados (Gordon 2003).

#### 2.3.4. Fertilización *in vitro* (FIV)

La fertilización *in vitro* consistió en la fecundación de los óvulos, seleccionados como maduros y viables, con semen seleccionado de alta calidad. Para la fertilización *in vitro* se llevaron a cabo los siguientes pasos:

##### 2.3.4.1. Procesamiento del semen

El laboratorio Phönix Repro, cuenta con un banco de semen en un tanque de nitrógeno líquido con pajillas de múltiples toros. Los clientes seleccionan el semen deseado para cada vaca dentro del protocolo de PIV, según características a mejorar dentro de su finca. Estas muestras de semen ya han sido analizadas previo a su congelación, para confirmar la calidad del semen.

Una vez seleccionado el toro, se procede con la descongelación del semen. Se retira la pajilla del tanque, se mantiene en temperatura ambiente por tres segundos y luego se coloca en baño maría a 35°C por 30 segundos. Luego de la descongelación se debe analizar la muestra para confirmar una buena motilidad progresiva, esto debido a que un alto porcentaje de los espermatozoides no sobreviven el proceso de congelación y descongelación (Filipiak y Larocca 2012).

Seguidamente, se procedía a seleccionar y separar aquellos espermatozoides con mayor motilidad progresiva. Existen diferentes métodos para separar los

espermatozoides de buena calidad: la técnica de dos gradientes y la de “swim up”. En esta práctica se utilizó la primera, en la que se coloca el semen en un tubo con dos soluciones de densidades distintas (gradientes) y luego se procede a centrifugar por 15 minutos. De acá se obtiene un pellet al fondo del tubo con la solución concentrada de espermatozoides (Salazar Cartín 2019, Gordon 2003). Posteriormente, se recupera el pellet del fondo del tubo con una pipeta y el contenido es transferido a un tubo con medio de lavado, el cual es centrifugado. Este paso es de vital importancia para eliminar residuos de la solución utilizada para la separación espermática, cuya presencia puede afectar al momento de la fertilización y posterior desarrollo embrionario (Gordon 2003). Una vez centrifugado, se retira nuevamente el pellet formado en el fondo del tubo y es depositado en medio FIV comercial.

En este punto, se debe tomar una muestra del semen concentrado para evaluar motilidad y concentración seminal. La concentración se determina con una dilución del semen de 1:10 en agua, para matar los espermatozoides e inmovilizarlos. Posteriormente se coloca en una cámara de conteo Newbauer. Una vez obtenida la concentración se determina la dosis de inseminación necesaria para el grupo de óvulos a fertilizar, 1 millón de espermatozoides/ml de medio de fertilización (Speckhart et al 2022). Esta dosis puede variar entre  $1-2 \times 10^6$  espermatozoides/ml dependiendo del número de COCs a fertilizar, el uso de semen sexado o no, y la calidad del semen a utilizar (Galli et al. 2003).

#### 2.3.4.2. *Procesamiento de los COCs maduros y su inseminación*

Pasado el tiempo de maduración, los ovocitos están listos para fertilización por lo que son pasados del medio MIV al medio FIV comercial. Acá primero son lavados en gotas de medio FIV, para eliminar restos del medio anterior y luego ser colocados en las gotas de inseminación. Es ahí donde se coloca la dosis de semen y se incuban ambos gametos por 16-22 horas en condiciones específicas que se discutirán más adelante (Speckhart et al. 2022).

#### 2.3.5. *Cultivo in vitro (CIV)*

Posterior al periodo de fertilización, se obtienen posibles cigotos. Antes de iniciar el cultivo de estos, se procedió a remover las células del cúmulo, proceso conocido como denudación. *In vivo*, estas células son removidas por efecto mecánico dentro del tracto de la hembra, mientras que se ha evidenciado que en óvulos madurados *in vitro*, estas células pueden seguir adheridas 22-24 horas posteriores a la inseminación (Gordon 2003, Filipiak y Larocca 2012). En el laboratorio la denudación se realizó por efecto mecánico de pipeteo manual.

El siguiente paso era cultivarlos *in vitro* por 6-7 días en medio CIV comercial. Durante este periodo se da la primera división celular, activación del genoma embrionario y por último, la formación de un blastocisto (Niemann y Wrenzycki 2018).

Al inicio del desarrollo embrionario, el cigoto sufre lo que se conoce como segmentación, donde se convierte en un embrión multicelular a través de mitosis. Cada una de estas células formadas es conocida como blastómero (Murillo Ríos 2018). Aproximadamente 24 horas después del inicio del CIV, se sacó el cultivo de la

incubadora para control de la división celular. Se realizaba un chequeo en el estereoscopio para verificar la presencia de al menos dos blastómeros. Aquellas estructuras sin división celular fueron separadas a otra gota de cultivo.

Por último, en los días 5, 6 y 7 de CIV, se revisan los cultivos para clasificarlos y separarlos para uso en fresco o criopreservación, como se explica más adelante.

#### **2.4. Producción de embriones *in vivo***

Dado que la vaca tiene un ciclo estral con la ovulación de uno u ocasionalmente dos óvulos por ciclo, las vacas donadoras eran tratadas con el fin de incrementar su capacidad de producir óvulos maduros en un ciclo estral (superovular), aumentando así su capacidad de producir más embriones que pueden ser colectados y transferidos a vacas receptoras. La superovulación se inducía con FSH extraída de hipófisis suina (Bo y Mapletoft 2014).

El protocolo de superovulación y colecta de embriones *in vivo* incluye los siguientes pasos (Niemann y Wrenzycki 2018; Filipiak y Larocca 2012):

a) se sincroniza la onda folicular emergente utilizando estradiol y progesterona (PG).

En el día 0 se introduce un dispositivo intravaginal de PG y se inyectan 2 mg de benzoato de estradiol vía IM.

b) en el día 4 se inicia la aplicación de FSH dos veces al día, vía IM, por 4-5 días.

c) en el día 5-6 se induce luteólisis con prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF).

d) pasadas 24 horas de la dosis de PGF, se retira el dispositivo intravaginal y se discontinúa la FSH

- e) se administra hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) 24 horas después de la remoción del dispositivo con el fin de sincronizar el celo. En caso de no querer sincronizar el celo, este se evidencia naturalmente 36-48 horas después de la administración de PGF.
- f) luego de que la hembra es superovulada, debe ser inseminada ya sea por monta natural o IA, 12 y 24 horas después de la aplicación de GnRH o al momento de la observación del celo y 12 horas después.
- g) a los 6-8 días post-estro, se realiza la recolección transcervical por lavado de los cuernos uterinos. Primero se realiza una anestesia epidural, así como lavado y desinfección de la vulva. Luego se coloca un catéter en la porción craneal de uno de los cuernos uterinos, y una vez colocado ahí se ancla inflando el balón del catéter y se acopla un tubo de drenaje en Y.
- h) seguidamente se procede con el lavado con medio PBS (solución salina amortiguada por fosfatos,) a 37°C, utilizando aproximadamente 500 mL por cuerno. Los embriones producidos se encuentran en el líquido recuperado, el cual es pasado por un filtro para embriones. El volumen colectado debe ser similar al introducido.
- i) se repite el procedimiento en el cuerno contrario.
- j) una vez realizado el procedimiento en ambos cuernos, se retira el catéter y el contenido de este filtro es analizado para realizar la identificación y colecta de los embriones.

- k) los embriones colectados son colocados en medio de mantenimiento (“Holding”) donde son clasificados para determinar diferentes parámetros que se detallan en la sección siguiente.

## **2.5. Evaluación y clasificación de los embriones bovinos.**

Una vez producidos los embriones ya sea *in vivo* o *in vitro*, son evaluados con un estereoscopio con aumento 50-100x. Los embriones son clasificados con un código numérico dependiendo de su estado de desarrollo (1-9) y calidad (1-4). El estado de desarrollo del embrión fue evaluado y comparado con el estado que debería de presentar de acuerdo con la edad que presentaba, es decir, la cantidad de días de cultivo que llevaba en un momento determinado ya sea *in vivo* o *in vitro* (Bo y Mapletoft 2013). En el Cuadro 3 se describen los criterios de clasificación según estado de desarrollo del embrión.

**Cuadro 3.** Criterios de clasificación según estado de desarrollo del embrión (Bo y Mapletoft 2013).

<b>Estado de desarrollo</b>	<b>Código</b>	<b>Descripción</b>
Mórula	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mínimo 16 células, donde es difícil diferenciar los blastómeros.</li> <li>• Masa celular ocupa mayoría del espacio perivitelino.</li> </ul>
Mórula compacta	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coalescencia de blastómeros individuales, formando una masa compacta.</li> <li>• Masa celular ocupa 60-70% del espacio perivitelino.</li> </ul>
Blastocisto temprano	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia de blastocele.</li> <li>• Embrión ocupa 70-80% del espacio perivitelino.</li> <li>• Dificultad para diferenciar el macizo celular interno de las células trofoblásticas.</li> </ul>
Blastocisto	6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferencia marcada entre la capa trofoblástica y el macizo celular interno.</li> <li>• Blastocele prominente.</li> <li>• Embrión ocupa mayoría del espacio perivitelino.</li> </ul>
Blastocisto expandido	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento del diámetro del embrión.</li> <li>• Adelgazamiento de la zona pelúcida.</li> </ul>
Blastocisto eclosionado	8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embriones eclosionados o exteriorizados de la zona pelúcida.</li> <li>• Pueden ser esféricos con blastocele definido o pueden estar colapsados.</li> </ul>
Blastocisto eclosionado expandido	9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embriones exteriorizados a la zona pelúcida y en expansión</li> <li>• Morfológicamente similares a estado 8, pero con mayor diámetro.</li> </ul>

Por otro lado, se evaluaba la calidad del embrión según la integridad morfológica del mismo (Cuadro 4). En general, un embrión ideal debe ser compacto y esférico, con blastómeros uniformes en color y textura. Los blastómeros no deberían de ser granulados ni vesiculados. Además, el espacio perivitelino deber ser claro y sin detritos (Bo y Mapletoft 2013).

**Cuadro 4.** Clasificación según calidad del embrión (Bo y Mapletoft 2013).

Calidad	Código	Descripción
Excelente	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Masa celular simétrica y esférica con blastómeros uniformes en tamaño, color y densidad.</li> <li>• Embrión en el estado de desarrollo correspondiente según el tiempo transcurrido.</li> <li>• 85% de la masa celular está intacta.</li> <li>• Zona pelúcida limpia y sin concavidades.</li> <li>• Tasa alta de sobrevivencia a la criopreservación.</li> </ul>
Bueno	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Masa celular con irregularidades en forma asimétrico o con blastómeros irregulares en tamaño color y densidad.</li> <li>• 50% de la masa celular está intacta.</li> <li>• Tasa de supervivencia a la criopreservación menor que aquellos de Grado 1.</li> </ul>
Malo	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Masa celular con irregularidades significativas en la forma de la masa embrionaria y/o con blastómeros irregulares en tamaño, color y densidad.</li> <li>• 25% de la masa celular está intacta.</li> <li>• Estos embriones no sobreviven el proceso de criopreservación.</li> <li>• Viables para transferencia en fresco con una menor tasa de preñez.</li> </ul>
Muerto o en proceso de degeneración	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pueden ser embriones, ovocitos no fertilizados (sin división celular) o embriones de 1 célula.</li> <li>• Son considerados no viables y son descartados.</li> </ul>

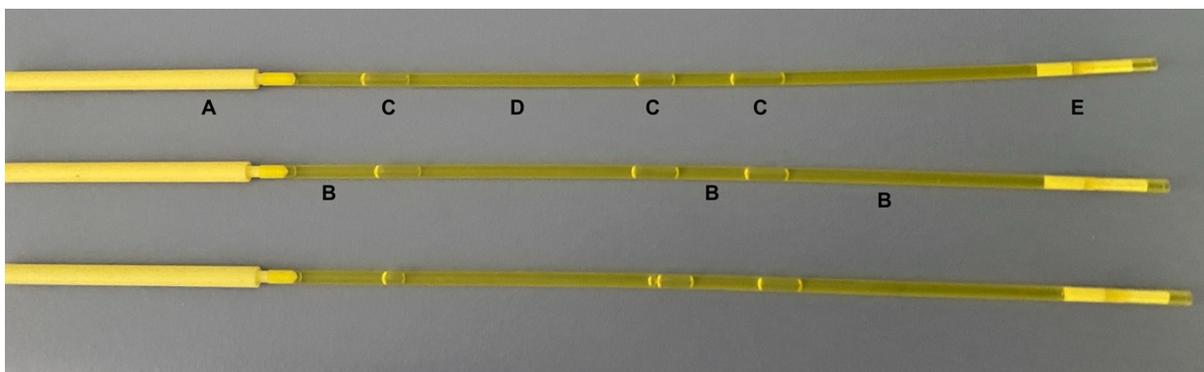
En PIV, los embriones fueron evaluados según estos criterios en los días 5, 6 y 7 de CIV del embrión, dos veces al día, en la mañana y en la tarde. Mientras que, los embriones producidos *in vivo* eran analizados en el líquido de colecta, donde se realizaba su respectiva clasificación. Una vez clasificados, se determinaba su viabilidad para criopreservación o para transferencia en fresco y eran enviados a sus respectivos centros de transferencia.

## 2.6. Criopreservación de embriones producidos *in vivo* e *in vitro*

Actualmente, se utilizan dos métodos de criopreservación en embriología: congelación lenta y vitrificación. La diferencia entre ambos radica en la concentración de crioprotectores y las velocidades de enfriamiento (Vatja y Kuwayama 2006). La primera, es la utilizada mayoritariamente en Phönix Repro y por lo tanto la técnica aprendida por la pasante.

El protocolo de congelación lenta es bastante estándar y en términos generales, se da de la siguiente forma: inicialmente, se lavaban los embriones seleccionados, para evitar la transmisión de enfermedades y el acarreo de contaminantes de los medios anteriores. Para esto se pasaban por 4-5 gotas de medio de lavado PBS y por último en medio de mantenimiento. Luego se procedía a colocar el embrión a congelar en el agente crioprotector, que es una solución hipertónica como etilenglicol o glicerol, de acuerdo con el criterio del veterinario de turno. Aquí se dejaba equilibrar osmóticamente por 5-10 minutos a temperatura ambiente (Youngs 2011).

Luego, los embriones eran introducidos en pajillas de 0.25 ml, las cuales se rellenaban con columnas de medio de mantenimiento y crioprotector que contiene el embrión. Las columnas eran separadas por burbujas de aire, con el fin de aislar el embrión dentro de la pajilla. Una vez llenada la pajilla, el tapón de algodón y cloruro de polivinilo sella un extremo de la pajilla. Finalmente, el otro extremo de la pajilla era sellada con un tapón de plástico, que llevaba la información del embrión correspondiente (Gordon 2003, Youngs 2011), así como se muestra en Figura 1.



**Figura 1.** Pajillas para criopreservación de embriones. El detalle de las secciones en las pajillas es el siguiente: A – Tapón donde se coloca la información del embrión. B – Solución de crioprotector. C – Burbuja de aire. D – Solución crioprotectora con el embrión. E – Tapón de algodón con cloruro de polivinilo.

Una vez cargadas las pajillas, se colocaban dos minutos en la máquina de enfriamiento con nitrógeno líquido, predeterminado entre  $-5.5$  y  $-7^{\circ}$  C. Luego se inducía la cristalización (“seeding”), en la columna que contiene el embrión, para poder continuar con el enfriamiento a una tasa de  $0.3-0.6^{\circ}$ C/min hasta llegar a  $-32^{\circ}$ C. Por último, las pajillas eran retiradas de la máquina y almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido (Murillo Ríos 2018, Youngs 2011).

## 2.7. Transferencia de embriones: en fresco y crio-preservados

Para la transferencia de embriones, tanto en fresco como crio-preservados, es crucial sincronizar el ciclo estral de la vaca receptora con el estado de desarrollo del embrión. Siendo así, las receptoras eran seleccionadas a partir de la observación del celo natural o inducido, a partir del cual se dejaban pasar 6-7 días, para acoplarse al estado de desarrollo del embrión al momento de la transferencia, con presencia de un cuerpo lúteo (CL). Para la transferencia de múltiples embriones en un mismo día, se

puede utilizar un protocolo de Transferencia de Embriones a Tiempo Fijo (TETF), donde se preparan varias receptoras, sin la necesidad de detección de celo, con protocolos de Ovsynch o Cosynch (Niemann y Wrenzycki 2018). Para la transferencia de embriones en fresco se debe sincronizar el celo de la donadora con sus correspondientes receptoras, por lo que se aplica el protocolo de sincronización de manera simultánea en ambas.

Durante la pasantía se utilizó el Ovsynch, que consiste en la aplicación de GnRH (día 0), con el fin de inducir la ovulación del folículo dominante presente y la generación de una nueva onda folicular. Seguidamente, siete días después se aplica PGF (día 7) para inducir luteólisis y 48 horas después (día 9) se aplica GnRH nuevamente, para inducir liberación de hormona leutinizante (LH) y sincronización de la ovulación (Bo et al. 2004).

Pasados siete días desde la segunda aplicación de GnRH, se evalúa la posible receptora con ultrasonido y se confirma la presencia de un cuerpo lúteo funcional, encargado de secretar PG, hormona que participa en el reconocimiento materno y es esencial para el mantenimiento de la preñez (Thomson et al. 2021). Luego se procede a preparar la vaca receptora, aplicando anestesia epidural y desinfectando la vulva.

En el caso de embriones crio-preservados, se realizó el protocolo de descongelamiento de la siguiente manera. Primero, se retiró la pajilla del tanque de nitrógeno y se mantuvo en el aire por 3-5 segundos. Luego, se colocaba en un baño maría a 37°C por 30 segundos. Por último, se secó la pajilla, se removió el tapón de identificación del embrión y luego, se procedió a montar la pajilla en la pistola de TE (Youngs 2011). En el caso de transferencias en fresco, se llena una pajilla con tres

columnas de medio de mantenimiento (“holding”) separadas por una burbuja de aire y en la columna central se coloca el embrión (Bo y Mapletoft 2018).

La pistola de transferencia cargada con su correspondiente pajilla era cubierta con una funda y camisa sanitaria. En el traslado de la pistola preparada hacia la receptora, se deben evitar cambios drásticos en temperatura, la cual debe mantenerse similar a la corporal. De hecho, la pajilla de transferencia debe alistarse justo antes de transferir, debido a que el tiempo transcurrido afecta el establecimiento de la preñez, idealmente no más de cinco minutos (Niemann y Wrenzycki 2018). La pistola era introducida hasta el cérvix, donde se retiraba la camisa sanitaria, antes de atravesarlo y se avanzaba hasta el ápice del cuerno uterino ipsilateral al CL, lugar de elección para depositar el embrión (Youngs 2011, Filipiak y Larocca 2012).

## **2.8. Otras actividades realizadas**

### *2.8.1. Ecografía del tracto reproductivo femenino*

La ecografía es una herramienta valiosa para el estudio de estructuras anatómicas y funcionales del aparato reproductor de la vaca.

La pasante observó y asistió al médico de planta al utilizar el ecógrafo en las sesiones OPU a través de la pasantía para la identificación de folículos. Adicionalmente, se permitió a la pasante realizar la evaluación reproductiva con ecógrafo, bajo supervisión del médico de planta. De esta manera se realizó diagnóstico de preñez en vacas de la estación de donadoras y tres fincas asociadas con la empresa. Además, se participó en la selección de receptoras, donde se confirmaba la presencia de un CL con ecografía en dos fincas.

### *2.8.2. Visitas a la estación de colecta de semen RBB*

La estación de colecta de semen RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg GmbH”, donde la pasante realizó visitas del 22 al 25 de mayo, se enfoca en la producción de pajillas de semen de alta calidad. En esta estación se realiza el procesamiento completo del semen, desde la colecta hasta el envío para distribución de pajillas congeladas. Durante el tiempo en esta instalación se observó con detalle dicho proceso.

Este centro aloja toros de la empresa y adicionalmente renta espacios a propietarios que quieran obtener pajillas de sus propios machos. Todos los animales alojados en las instalaciones contaban con un comprobante de salud emitido por un veterinario para evitar la entrada de enfermedades, en especial de transmisión sexual como diarrea viral bovina, tricomoniasis, brucelosis, leptospirosis, entre otras.

Las instalaciones cuentan con recintos individuales para los animales y recintos de colecta, donde utilizan un compañero de monta para estimular el toro. Una vez que el toro realiza la monta falsa, se desvía el pene y se introduce en una vagina artificial para estimular la eyaculación.

El laboratorio se encuentra adyacente a la sala de colecta, por lo que el eyaculado es procesado inmediatamente. En este punto se determina concentración, volumen y motilidad progresiva con un sistema de análisis seminal asistido por computadora (CASA por sus siglas en inglés). A partir de la concentración, se determina la cantidad de dosis obtenidas de ese eyaculado, que es un aproximado de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/dosis (Almela Veracruz 2014).

Posteriormente, el semen es mezclado con el diluyente, según el volumen y concentración y es colocado en una cámara fría a 5°C por 24 h, para equilibrar la solución. En el día 2, se agrega el crio-protector y se empacan las pajillas de 0,25 mL, que finalmente son colocadas en la máquina de congelación automatizada con nitrógeno líquido que disminuye la temperatura en un rango de -10°C a -80°C/min (Gordon 2003).

Por último, las pajillas son almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido, donde se mantienen en cuarentena por un mes. Luego son transportadas al depósito de semen ubicado en la misma estación de colecta. A partir de ahí son enviadas a los respectivos clientes o propietarios.

### *2.8.3. Curso de IA.*

Durante la semana del 24 al 27 de abril la pasante participó en un curso de IA impartido por “Instituto de Reproducción de Animales de Granja Schönöw e.V.”, ubicado en el mismo edificio que el laboratorio Phönix Repro.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Producción de embriones *in vitro*

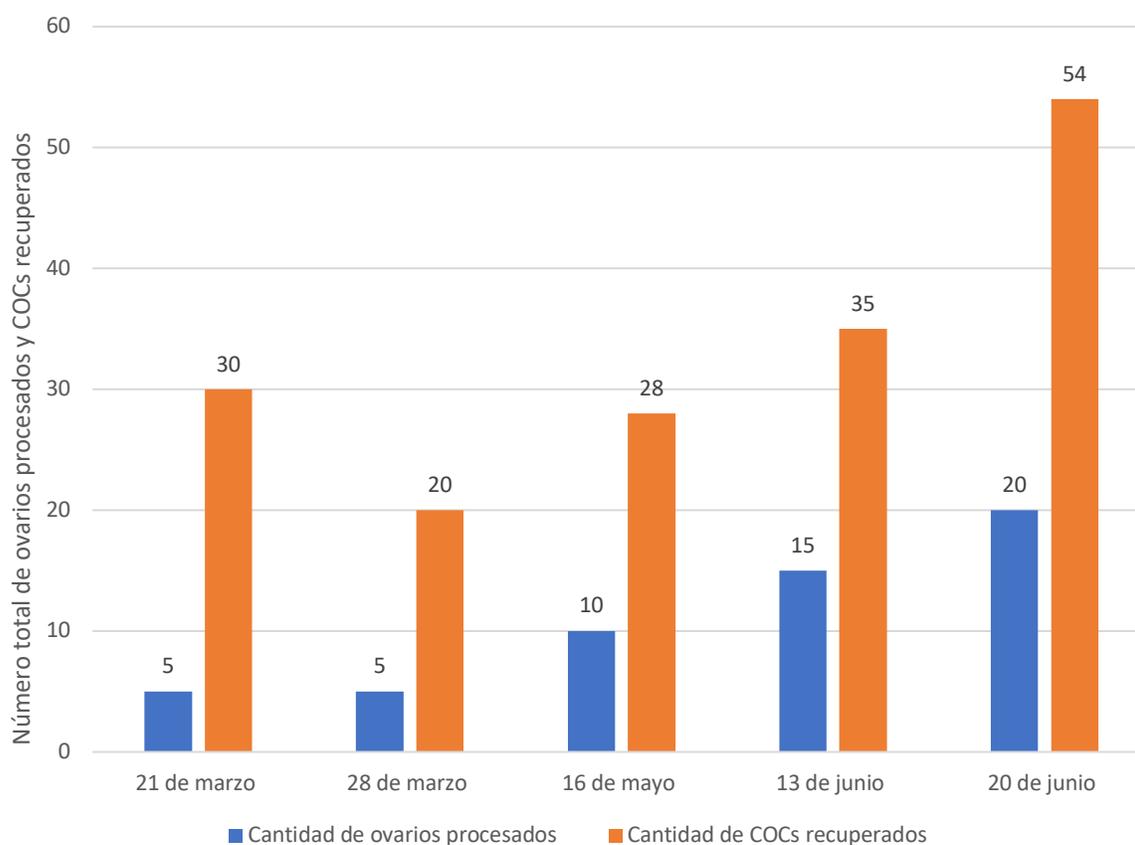
Se participó por medio de observación, discusión y asistencia en las diferentes etapas de las rondas semanales de PIV de vacas comerciales. Esa empresa realizaba por mes la aspiración folicular de aproximadamente 50 novillas, produciendo en promedio unos 150 embriones *in vitro* por mes. Un 95% de estos fueron congelados y un 5% se prepararon para transferencia en fresco.

Se colaboró también en la preparación de tubos de IVM y placas de IVF e IVC (n= 175). Además, se asistió en las pruebas de control de calidad semanales del laboratorio, que incluían control de temperatura en las placas térmicas, revisión de concentraciones de gases (nitrógeno y dióxido de carbono) en las incubadoras y monitoreo de las concentraciones de los tanques de gases del laboratorio, entre otros.

En las siguientes secciones se detalla la participación práctica en las diferentes etapas de PIV por parte de la pasante, enfocado en sus propias rondas de producción de embriones. Adicionalmente su participación en OPU.

##### 3.1.1. Recuperación de ovocitos

Para la recuperación de COC se realizaron cinco recuperaciones, distribuidas a lo largo de la pasantía (Figura 2), utilizando el método de rayado, mediante cortes al ovario *ex vivo*.



**Figura 2.** Distribución de la cantidad de ovarios procesados con el método de rayado al ovario *ex vivo* y la cantidad de COCs recuperados en cada ronda de PIV

Como se muestra en la Figura 2, la cantidad de COC recuperados varía, con un total de 167 COC recuperados, para un promedio de 3,6 COC por ovario. La tasa de recuperación depende de varios factores, por ejemplo el estado de los ovarios obtenidos de planta de cosecha, que depende de factores tales como la calidad y cantidad de folículos presentes en cada ovario, la condición corporal y de salud las vacas, entre otros.

A lo anterior se suma el hecho de que la recuperación de COCs por el método de rayado del ovario, se realizó posterior a la aspiración directa realizada por los miembros del equipo Phönix. En otras palabras, la mayor parte de los folículos y sus COCs ya habían sido extraídos.

En relación con la colecta de COC *in vivo*, la pasante participó en procedimientos OPU realizados en calidad de asistente de un veterinario de planta, encargado de las actividades de campo. Dentro de las funciones realizadas se incluyen la preparación del equipo para OPU, revisión de la presión de aspiración, introducción de la sonda de US en la vagina, introducción de la aguja en el sistema de guía, control de la bomba de vacío y manejo del registro de resultados. En total se colaboró en 51 aspiraciones foliculares y en el Cuadro 5 se desglosa la cantidad de OPU en la que se participó por mes.

**Cuadro 5.** Distribución de la participación en OPU por mes.

<b>Mes</b>	<b>Cantidad de OPU</b>
Marzo	18
Abril	6
Mayo	16
Junio	11

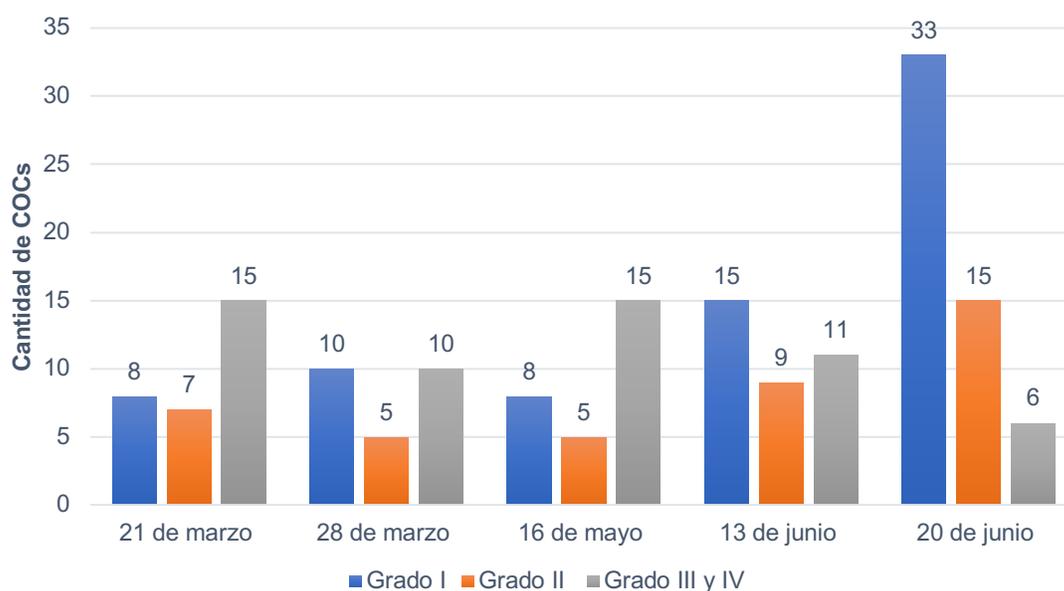
La tasa de recuperación de COCs varía según factores técnicos y biológicos. Dentro de los primeros están la calidad del US, diámetro de la aguja utilizada, presión de aspiración y experiencia del operador. La presión se mide en mililitros aspirados por minuto que debería de estar en un rango que mantenga la morfología de los COCs, aproximado de 20-26 ml/min. Si la presión es muy baja disminuye las posibilidades de extracción del ovocito, pero si es muy alta afecta la calidad del ovocito al denudarlo de las células del cúmulo (Palma 2001).

Por otro lado, existen factores biológicos que afectan los resultados OPU. Por ejemplo, la presencia de folículos dominantes disminuye la capacidad de los folículos

subordinados (Bols y Stout 2018). Adicionalmente, las vacas donadoras se pueden estimular previamente con hormonas para modificar la actividad ovárica y como resultado se puede modificar la calidad y la cantidad de COCs recuperados (Alvarado Malca et al. 2016). Además, el estado fisiológico y condición corporal de la donadora influyen la capacidad de recuperación. Se han reportado oocitos de mala calidad en animales con baja condición corporal (Bols y Stout 2018). El procedimiento OPU se puede realizar en animales desde novillas prepuberales hasta vacas adultas preñadas de tres meses (Bols y Stout 2018; Qi et al 2013).

### 3.1.2. Determinación de la calidad de COCs

La clasificación de los COCs recuperados durante las rondas de PIV a cargo de la pasante se muestra en la Figura 3.



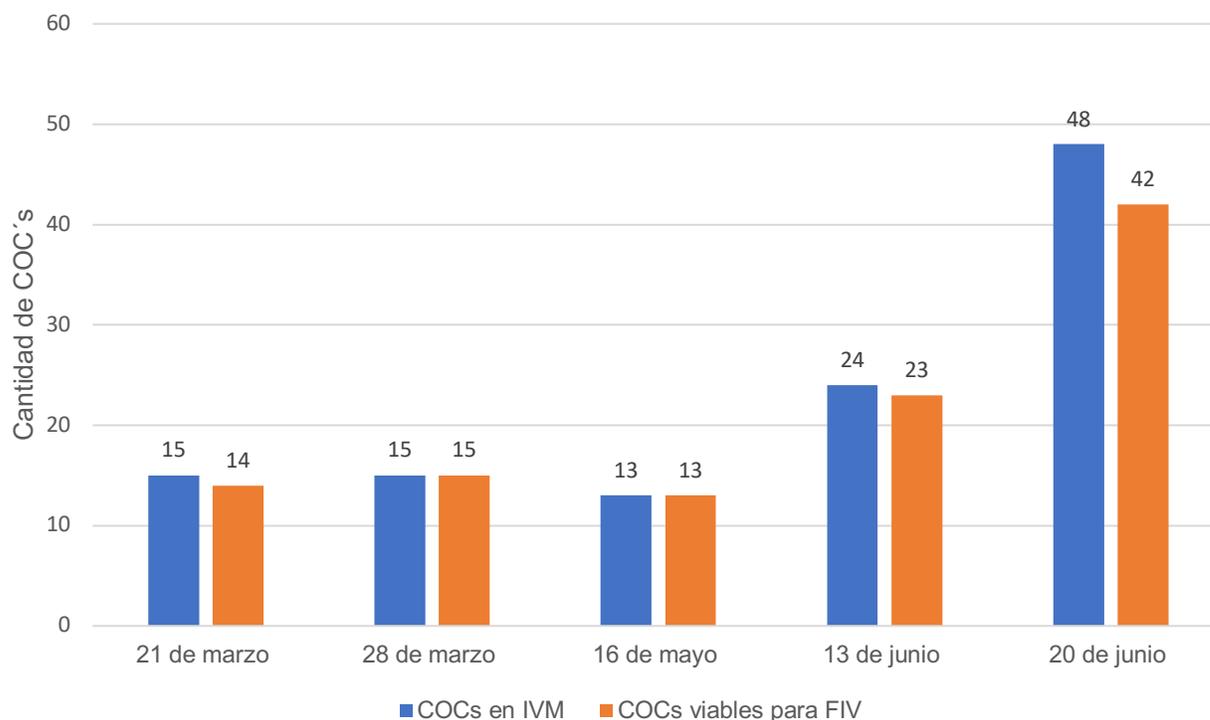
**Figura 3.** Clasificación por calidad de los COC recuperados por la pasante en las rondas de producción de embriones in vitro, antes de MIV.

Estos COCs fueron clasificados con los criterios especificados previamente en el Cuadro 2. La importancia de definir de manera eficiente la calidad de un COC radica en que esta determina su capacidad de reiniciar meiosis, interactuar con el espermatozoide, producir un cigoto funcional y la subsecuente activación del genoma embrionario (Luciano y Sirard 2018). En concordancia con lo anterior, los COCs grado I y II fueron seleccionados para continuar con MIV.

La clasificación según calidad es basada en una evaluación visual de su morfología, tomando en cuenta varios factores. Primero, el grado de compactación y cantidad de células del cúmulus, ya que los ovocitos tienen una conexión entre las células del cúmulus que rodean la zona pelúcida y el ooplasma a través de uniones tipo GAP conocidas como terminaciones de procesos de las células del cúmulo (CCPEs por sus siglas en inglés) (Niemann y Wrenzycki 2018). Estas uniones son vitales en la capacidad de maduración y fecundación del ovocito (Hoshi 2003). Segundo, se debe observar la homogeneidad y transparencia del ooplasma. Por último, se revisa el tamaño del ovocito, puesto que un ovocito pequeño menor a 110  $\mu\text{m}$  tiene una menor posibilidad de reiniciar exitosamente la meiosis (Niemann y Wrenzycki 2018).

### 3.1.3. *Maduración In vitro (MIV)*

Pasado el tiempo de incubación para MIV, se seleccionó los COCs maduros y viables para continuar con FIV, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Selección de COC´s viables para continuar a FIV dentro de las rondas de producción de embriones de la pasante.

Los ovocitos post nacimiento se mantienen en estado diploide en meiosis I. Posteriormente, a partir de la pubertad en cada ciclo estral se disparan picos de la LH y la FSH que inducen la reanudación de la división celular, concluyendo con la meiosis I y continuando hasta la metafase II, donde el ovocito se detiene nuevamente. Seguidamente, con la ovulación se expulsa el segundo cuerpo polar y se obtiene un óvulo maduro listo para ser fecundado. Este proceso es conocido como maduración nuclear (Ferreira et al 2009).

Al mismo tiempo, el citoplasma del ovocito se reorganiza para esperar la fertilización y posterior inicio del desarrollo embrionario, conocido como maduración citoplasmática. Durante este periodo suceden varios eventos entre estos: metabolismo

de carbohidratos y lípidos, modificación de función mitocondrial y reubicación, reducción de radicales libres, programación epigenética, comunicación de CCPEs y secreción de factores de crecimiento derivados del ovocito (Niemann y Wrenzycki 2018).

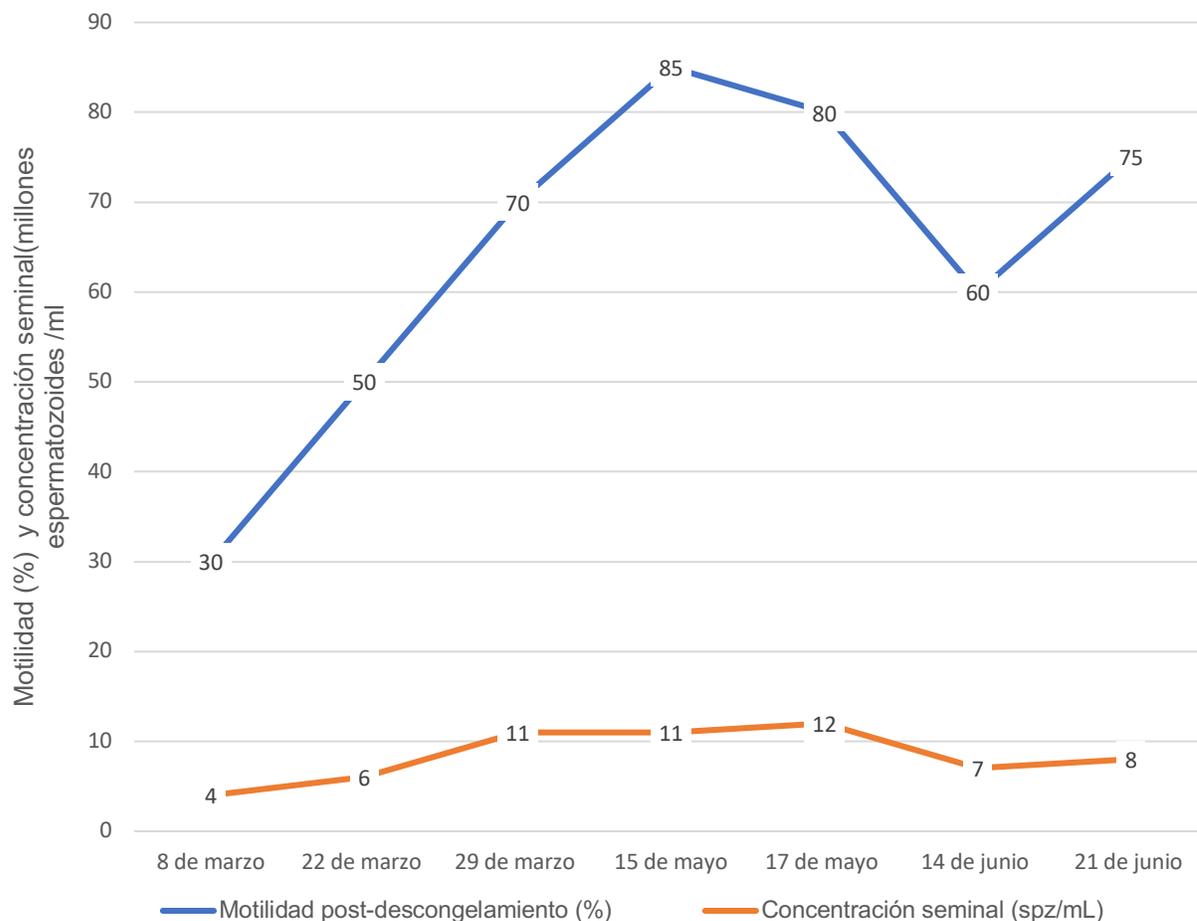
La MIV simula el proceso de ovulación que inicia con la extracción del óvulo del medio folicular y se fortalece con el soporte de sustancias dentro del medio de maduración que permiten la expulsión del segundo cuerpo polar (Ferreira et al. 2009). De esta forma se inducen los procesos de maduración nuclear y citoplasmático; simulando el líquido folicular (Niemann y Wrenzycki 2018). Cabe destacar que los embriones madurados *in vitro* son de menor calidad que aquellos *in vivo*. Esto debido a múltiples factores, en especial el estrés oxidativo generado por el proceso *in vitro* (Callesen et al 2019).

La maduración es evaluada por el nivel de expansión de las células del cúmulo (CCs), ya que se asocia con una normalidad fisiológica del óvulo. Las CCs ayudan a sincronizar la maduración nuclear y citoplasmática, proporcionando soporte y nutrición al ovocito. Adicionalmente, *in vivo* estas células brindan la capacidad de adherirse al tracto reproductivo femenino (Gordon 2003; Turathum et al. 2021).

#### 3.1.4. Fertilización *In-vitro* (FIV)

Se tuvo la oportunidad de practicar el método de separación del semen, mediante la técnica simple de dos gradientes. Se realizó el procedimiento con siete pajillas de menor calidad, así como durante las cinco rondas de PIV, para las que se utilizó el semen de un toro control con un semen de alta calidad, destinado para fertilizar los

COCs de matadero. Luego de la técnica de separación, se realizó una evaluación de la motilidad post-descongelación y concentración seminal de las muestras. En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 5.** Datos obtenidos a partir del procesamiento del semen para FIV: motilidad post-descongelación y concentración seminal expresada en número de espermatozoides  $\times 10^6/\text{ml}$ .

En el sistema reproductor de la hembra, el espermatozoide sufre cambios estructurales, dados por reacciones bioquímicas y fisiológicas que permiten la selección de los espermatozoides con expresión de patrón de motilidad hiperactiva,

capacidad de responder a señales del ovocito y llevar a cabo una eventual reacción acrosómica exitosa (Gordon 2003; Rodríguez-Almeida et al 2008).

La separación de espermatozoides por gradiente, busca concentrar la mayor cantidad posible de espermatozoides con morfología normal y motilidad aceptable en un volumen pequeño que debe estar libre de detritos, células no espermáticas y espermatozoides muertos (Salazar Cartín 2019). Con la técnica simple de dos gradientes se separan los componentes de la muestra de semen por gradiente de densidad, de manera que aquellos espermatozoides con motilidad aceptable nadan al fondo del tubo formando un pellet, que es la porción con espermatozoides más viables. Este método es superior al de “swim up” puesto que permite obtener una mayor tasa de recuperación de espermatozoides satisfactorios, además de buena separación de detritos y otras células (Gordon 2003, Salazar Cartín 2019).

Seguidamente, la pasante realizó la fertilización de los COCs con adecuada maduración (n=107), procesados durante cinco rondas. Durante el tiempo de incubación, el gameto masculino debe pasar la capa de células del cúmulo, realizar la reacción acrosómica para penetrar la zona pelúcida y adherirse al oolema activando el ovocito. Una fertilización exitosa se caracteriza y evidencia por la extrusión del segundo cuerpo polar y la formación de los pronúcleos femenino y masculino (Niemann y Wrenzycki 2018).

Cabe destacar que las condiciones en las que se incuban los gametos favorecen el éxito de la fertilización que depende de muchos factores que buscan simular la situación *in vivo*. Para citar algunos ejemplos, el manejo de la concentración de oxígeno durante la fertilización es vital, ya que es una fuente de especies reactivas de

oxígeno. Estas moléculas pueden ser perjudiciales para los espermatozoides en altas concentraciones, sin embargo, son necesarias como segundos mensajeros para la capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica. Siendo así, *in vitro*, se ha demostrado que concentraciones de oxígeno aproximadas del 20% son indispensables durante la fertilización y maduración lo que aumenta la cantidad de blastocistos obtenidos (Morado et al. 2009, Park et al. 2011). Además, la temperatura debe ser similar a la temperatura corporal de la vaca, por lo que los gametos son incubados a 39°C. También hay que tomar en cuenta muchos otros factores como los ingredientes del medio, incubación en grupos en lugar de ovocitos individuales, estrés oxidativo, entre otros (Gordon 2003).

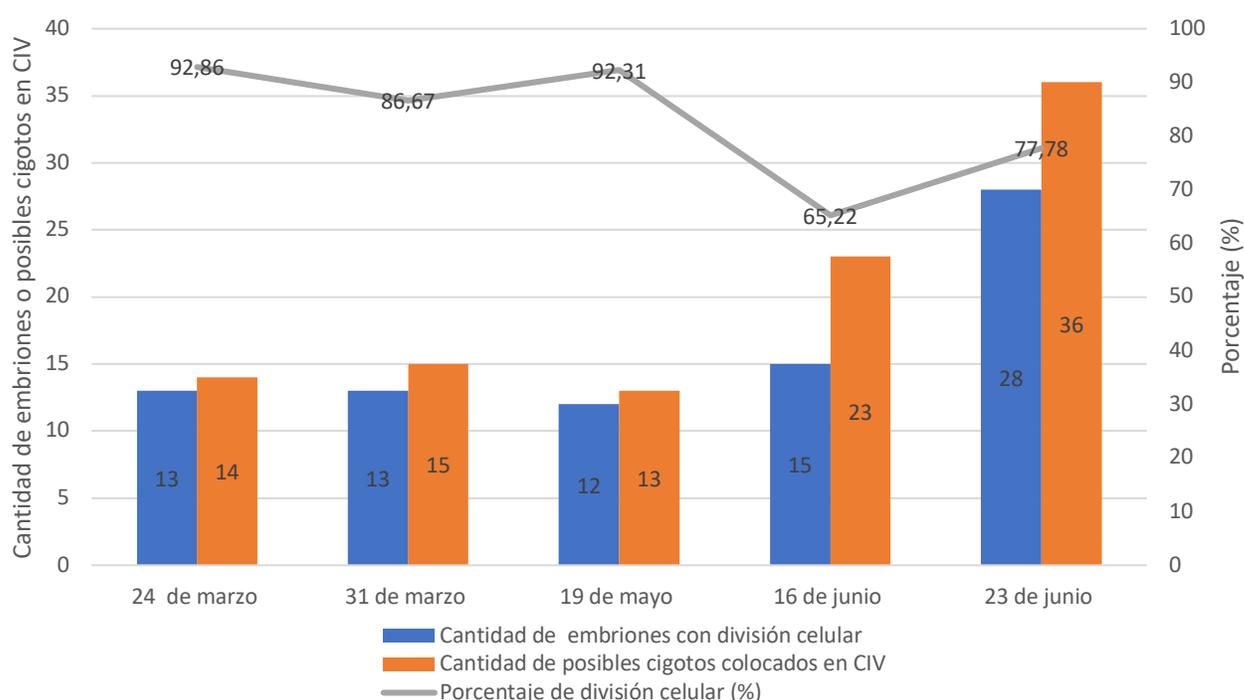
### 3.1.5. Cultivo *In-vitro* (CIV)

Previo a la colocación de los posibles cigotos producidos por la pasante en CIV, se realizó la respectiva denudación (n= 101). A pesar de que las células del cúmulo son de vital importancia durante la fertilización, para el desarrollo embrionario pueden ser perjudiciales. Esto debido a que estas células en el medio de cultivo consumirían sus componentes, agotando las fuentes energéticas por efecto competitivo con los embriones (Gordon 2003).

Los posibles cigotos fueron cultivados en un medio de cultivo, que tiene los nutrientes necesarios para permitir el desarrollo embrionario. Actualmente se utiliza ampliamente medio sintético de fluido del oviducto (SFO) (Niemann y Wrenzycki 2018). Estos medios se han fabricado tomando en cuenta el metabolismo del embrión, las preferencias de sustrato energético, pH, osmolaridad y otros requerimientos nutritivos

como aminoácidos, macromoléculas, agua y sales (Gordon 2003). La cantidad y calidad de blastocistos obtenidos está directamente relacionada con la calidad del medio utilizado (Niemann y Wrenzycki 2018).

A las 24 horas de CIV, se retiraron las muestras de la incubadora y se evaluó la división celular. En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos en los cultivos obtenidos.



**Figura 6.** Resultados de la revisión de división celular en el día 1 (24 horas) de CIV, se muestra la cantidad de embriones colocados en CIV, la cantidad de embriones divididos y el porcentaje de división.

En el gráfico se evidencia una disminución del porcentaje de división celular obtenido en la cuarta ronda de producción (16 de junio). Esto se asocia con la manipulación de un número mayor de COCs, pues en las rondas anteriores se manejaron 15, 14 y 13 COCs, cuando en esta ronda se manejaron 24. Siendo así, se

aumenta el tiempo de manipulación de los embriones a la hora de hacer la denudación en el día 0 de CIV. Esto implica un mayor tiempo fuera de la incubadora la cual ofrece un ambiente óptimo para el desarrollo embrionario. Esto se ve evidenciado en la disminución de estructuras con división celular. Luego, en la quinta ronda (23 de junio), hubo una mejoría significativa en el porcentaje de división celular a pesar de manejar más COCs. Debido a los hallazgos en la ronda 4, se decidió utilizar una placa de FIV adicional para denudación. De esta manera, se seleccionaron grupos de 6-8 posibles cigotos de la placa de FIV y fueron traspasados a la placa adicional. Posteriormente se devolvió la placa con el resto de posibles cigotos a la incubadora, mientras se denudaba el pequeño grupo y se pasaba a CIV. Luego, se repetía nuevamente el proceso hasta denudar la totalidad de los COCs. De esta manera, se observó una mejoría significativa en el porcentaje de división celular.

A partir de las 24 horas de cultivo, la cantidad de blastómeros continúa en aumento sin afectar el tamaño del embrión, al estar encapsulado en la zona pelúcida. Inicialmente el embrión depende del genoma materno para iniciar el desarrollo, pero cuando alcanza 8-16 células, se da la activación del genoma embrionario (Cagnone y Sirard 2014). Una vez alcanzadas las 16 células, el embrión es conocido como mórula, aproximadamente entre los días 3-5 de CIV (Filipiak y Larocca 2012).

Durante este estado se sintetizan proteínas específicas que favorecen las uniones intercelulares oclusivas en los blastómeros periféricos que están aplanados y se desarrollan uniones gap en los blastómeros internos. La formación de estas uniones favorece la compactación de la mórula. Siendo así, entre los días 6-7 de CIV, se

alcanza el estado de mórula compacta (Filipiak y Larocca 2012), donde se va formando gradualmente una cavidad con líquido conocida como blastocele (Murillo Ríos 2018).

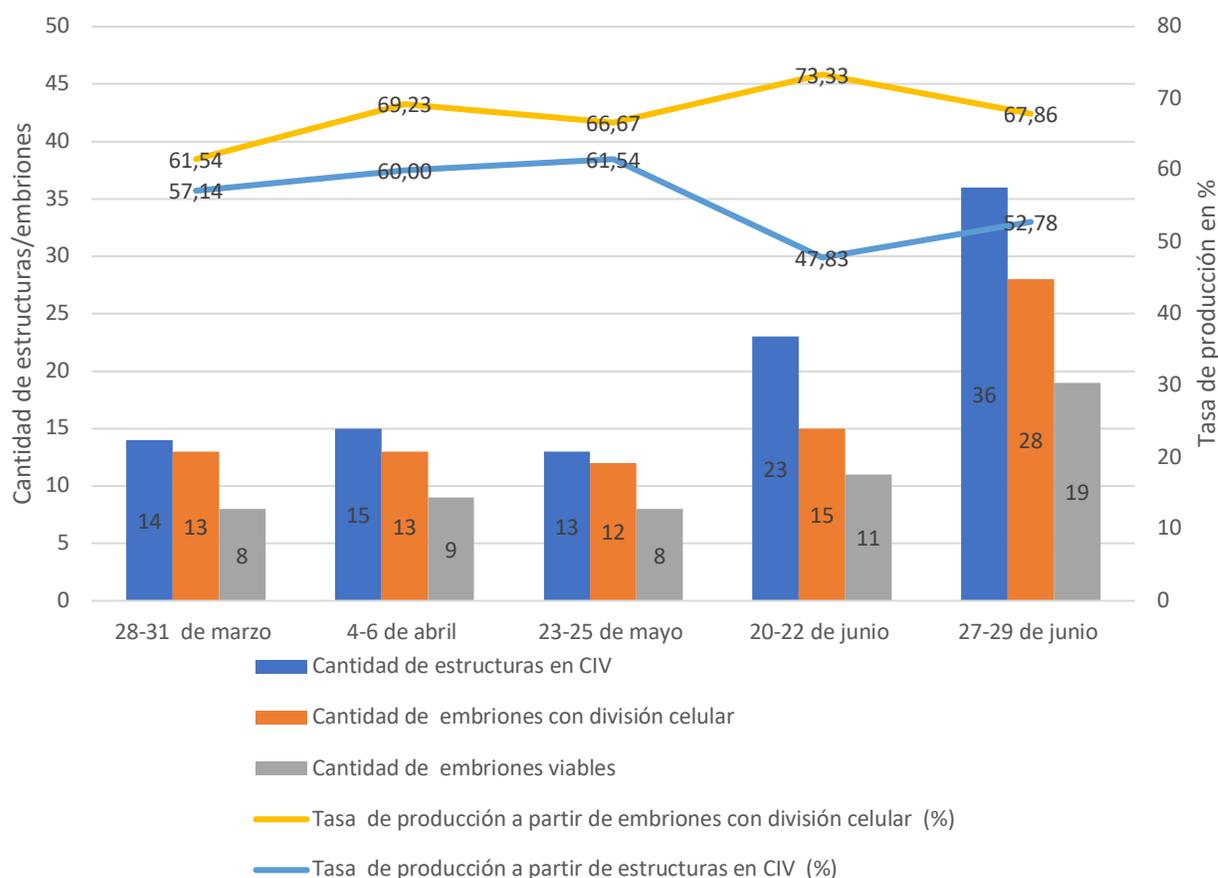
Una vez desarrollado el blastocele, la estructura embrionaria se conoce como blastocisto, dado entre los días 6-8 de CIV (Filipiak y Larocca 2012). Esta estructura embrionaria está compuesta por: el trofotodermo, la capa exterior que eventualmente forma parte de la placenta y membranas embrionarias; la masa celular interna definida como el conjunto de células pluripotentes que forman tejidos embrionarios y, por último, el blastocele, formado por el líquido acumulado por las bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en el trofotodermo. De tal manera, el blastocele continúa expandiéndose junto con un adelgazamiento de la zona pelúcida y aumento del tamaño del embrión. En este punto, se conoce como blastocisto expandido. Conforme sigue creciendo el blastocele, llega un punto en donde el embrión eclosiona y es liberado de la zona pelúcida (Gordon 2003; Murillo Ríos 2018).

En los días 5, 6 y 7 de CIV, se realizó la evaluación y clasificación de los embriones, dos veces al día (mañana y tarde). Para los embriones producidos a partir de vacas comerciales, se trabajó de manera observacional y mediante discusión durante las evaluaciones semanales a cargo del personal de la empresa. Mientras que los embriones producidos en las rondas de producción propias, fueron clasificados bajo la supervisión del Dr. González. Esto fue determinado según los criterios establecidos en los Cuadros 3 y 4, y el detalle de la clasificación realizada se muestra en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Clasificación según estado y calidad de los embriones producidos por la pasante.

Ronda de PIV	Cantidad de embriones producidos	Clasificación
Primera ronda	8	8:2 (n=1) 7:1 (n=3) 7:2 (n=1) 6:1 (n=1) 6:2 (n=2)
Segunda Ronda	9	8:1 (n=2) 7:1 (n=4) 7:2 (n=2) 7:3 (n=1)
Tercera Ronda	8	8:1 (n=2) 7:1 (n=5) 7:3 (n=1)
Cuarta Ronda	11	7:1 (n=3) 7:2 (n=2) 7:3 (n=1) 6:1 (n=2) 6:2 (n=3)
Quinta Ronda	19	8:1 (n=3) 7:1 (n=5) 7:2 (n=4) 7:3 (n=3) 6:1 (n=2) 6:2 (n=2)

Una vez determinada la clasificación, se logró establecer la tasa de producción de cada ronda PIV, como se muestra en la Figura 7, donde se presentan los resultados finales.



**Figura 7.** Resultados de las rondas de producción de embriones *in vitro* realizados por la pasante: cantidad de estructuras colocadas en CIV, cantidad de estructuras embrionarias con división celular, cantidad de embriones obtenidos y porcentajes de producción.

Cabe destacar que el éxito de la producción de embriones no depende únicamente de las condiciones de cultivo, sino de muchos otros eventos durante todo el proceso, desde la colecta hasta la obtención del blastocisto. Por tanto, hay que prestar atención a las condiciones de incubación, concentración de los gases, medio de cultivo, aceite utilizado para cubrir el medio, placas de Petri utilizadas, riesgo de contaminación, volumen del medio y experiencia del operario. Con respecto a la concentración de gases, en específico el oxígeno, en el oviducto *in vivo* se maneja una

concentración del 5-8,7%. Por lo que se ha demostrado que concentraciones del 5% de oxígeno durante CIV favorece el desarrollo embrionario (Fischer y Bavister 1993, Niemann y Wrenzycki 2018).

### 3.2. Producción de embriones *in vivo*

Durante la pasantía, se participó de manera observacional y de asistencia con un médico veterinario de planta especialista en la producción de embriones *in vivo*. La pasante colaboró en un total de 8 procedimientos de recuperación. En el Cuadro 7 se muestra la cantidad de vacas procesadas para recuperación de embriones *in vivo*, la cantidad de embriones obtenidos y la cantidad de embriones viables, con su respectiva clasificación. Además, se incluye el destino de los embriones obtenidos, ya sea criopreservación o transferencia en fresco.

**Cuadro 7.** Representación de los resultados obtenidos a partir de la producción de embriones *in vivo* en las que la pasante tuvo participación.

<b>Fecha del procedimiento</b>	<b>4 de abril</b>	<b>12 de abril</b>	<b>8 de mayo</b>
Cantidad de vacas donadoras	5	2	1
Cantidad de embriones recuperados	18	15	3
Promedio de embriones recuperados por vaca	3,6	7,5	3
Cantidad de embriones viables	13	12	1
Clasificación de embriones viables	7:1 (n=6) 7:2 (n=4) 6:1 (n=3)	7:1 (n=2) 6:1 (n=7) 6:2 (n=3)	7:1 (n=1)
Destino: criopreservación o transferencia en fresco	Criopreservación (n=13)	Transferencia en fresco (n=10) y criopreservación (n=2)	Criopreservación (n=1)

### **3.3. Criopreservación de los embriones producidos *in vivo* e *in vitro***

Se colaboró en el proceso de criopreservación del laboratorio con la preparación de las placas de soluciones de crioprotectores (n= 83), tanto para la congelación de los embriones producidos por la pasante como placas de práctica.

Además, se realizó un total de 73 prácticas de llenado de pajillas, tanto con los embriones producidos durante las rondas propias de PIV como en prácticas con embriones de baja calidad descartados de los cultivos de vacas comerciales. Adicionalmente, se realizó el proceso completo de congelación lenta en un total de ocho muestras, siete embriones producidos por la pasante y un embrión de baja calidad como práctica, este último fue descartado después de la congelación.

Con respecto a la criopreservación, este procedimiento tanto en semen como en embriones, es un proceso que disminuye la temperatura drásticamente, reduciendo el metabolismo y permitiendo una conservación por largos periodos de tiempo. Dentro de la producción bovina, este procedimiento tiene ventajas tales como: evitar dependencia de ciclicidad reproductiva y estado fisiológico de las vacas, creación de bancos de recursos genéticos, comercialización internacional de embriones, entre otras (Murillo Ríos 2018).

A la hora de preservar un embrión hay que tomar en cuenta que un 80% de su contenido es agua y se comporta como una membrana semi-permeable, capaz de reaccionar a presiones osmóticas de su ambiente. Siendo así, no se puede hacer una congelación ultra rápida porque el agua interna se cristaliza y da muerte al embrión. Por otro lado, la congelación ultra lenta, permite la cristalización del medio externo, lo que deshidrata el embrión por incremento de la presión osmótica y también causa

muerte del embrión. Por tanto, se utiliza una congelación lenta con uso de crioprotectores los cuales evitan daños causados por la cristalización intra y extracelular (Filipiak y Larocca 2012).

Los crioprotectores son clasificados como permeables o intracelulares e impermeables o extracelulares. Los primeros, incluyen el glicerol, D.M.S.O. y etilenglicol; estos reducen la cristalización intra y extracelular. De esta manera, se mantiene la fase líquida mientras se da la disminución de temperatura. Luego están los crioprotectores impermeables, que son moléculas grandes como la sacarosa, ácido hialurónico y ciertas proteínas que modifican el balance osmótico, evitando la deshidratación del embrión (Filipiak y Larocca 2012).

Inclusive utilizando crioprotectores, los embriones sufren daños morfológicos y funcionales durante la criopreservación. Sin embargo, los embriones tienen una alta capacidad de regeneración y de retomar el desarrollo, por lo que el objetivo de estos protocolos de conservación es minimizar el daño y aumentar la regeneración celular (Vatja y Kuwayama 2006). Los embriones PIV tienen una moderada tasa de supervivencia a la criopreservación, sin embargo, son más sensibles al proceso de congelamiento que aquellos producidos in vivo, sobre todo en etapas tempranas del desarrollo, antes de blastocisto (Gordon 2003).

La técnica utilizada en esta pasantía (congelación lenta) está ampliamente estandarizada, consiste en la disminución controlada de temperatura que permite un intercambio de soluciones entre el ambiente intra y extracelular, evitando efectos significativos osmóticos o deformación de células, aunque siempre se da cierta

formación de cristales. Se utilizan bajas concentraciones de crioprotectores, los cuales se asocian con baja toxicidad y shock osmótico (Niemann y Wrenzycki 2018).

Por otro lado, la vitrificación es un proceso de congelación rápido que utiliza un medio con altas concentraciones de crioprotectores que se solidifican, evitando la formación de cristales y aumentando la viscosidad de la muestra. Esta técnica tiene la ventaja de que disminuye el daño al embrión por el cambio de temperatura y la cristalización. El éxito de la técnica depende de: volumen y viscosidad de la muestra, tasa de enfriamiento y experiencia del personal (Filipiak y Larocca 2012, Niemann y Wrenzycki 2018). Durante la pasantía no se realizó el procedimiento; sin embargo, fue manejado mediante discusiones semanales con el Dr. González.

Cabe destacar, que la técnica comúnmente utilizada para preservar embriones producidos *in vivo* es la congelación lenta. Al tener una buena tasa de supervivencia post-congelación (Gómez et al. 2008). Sin embargo, se ha demostrado que los embriones producidos *in vitro* sufren más por la cristalización y tienen una tasa menor de retorno a desarrollo embrionario. Siendo así, la vitrificación es un método alternativo para preservación de embriones *in vitro*, al tener una mejor tasa de supervivencia embrionaria y ser más rápido. Por otro lado, requiere de personal entrenado y equipo especializado para obtener resultados exitosos (Do et al 2019).

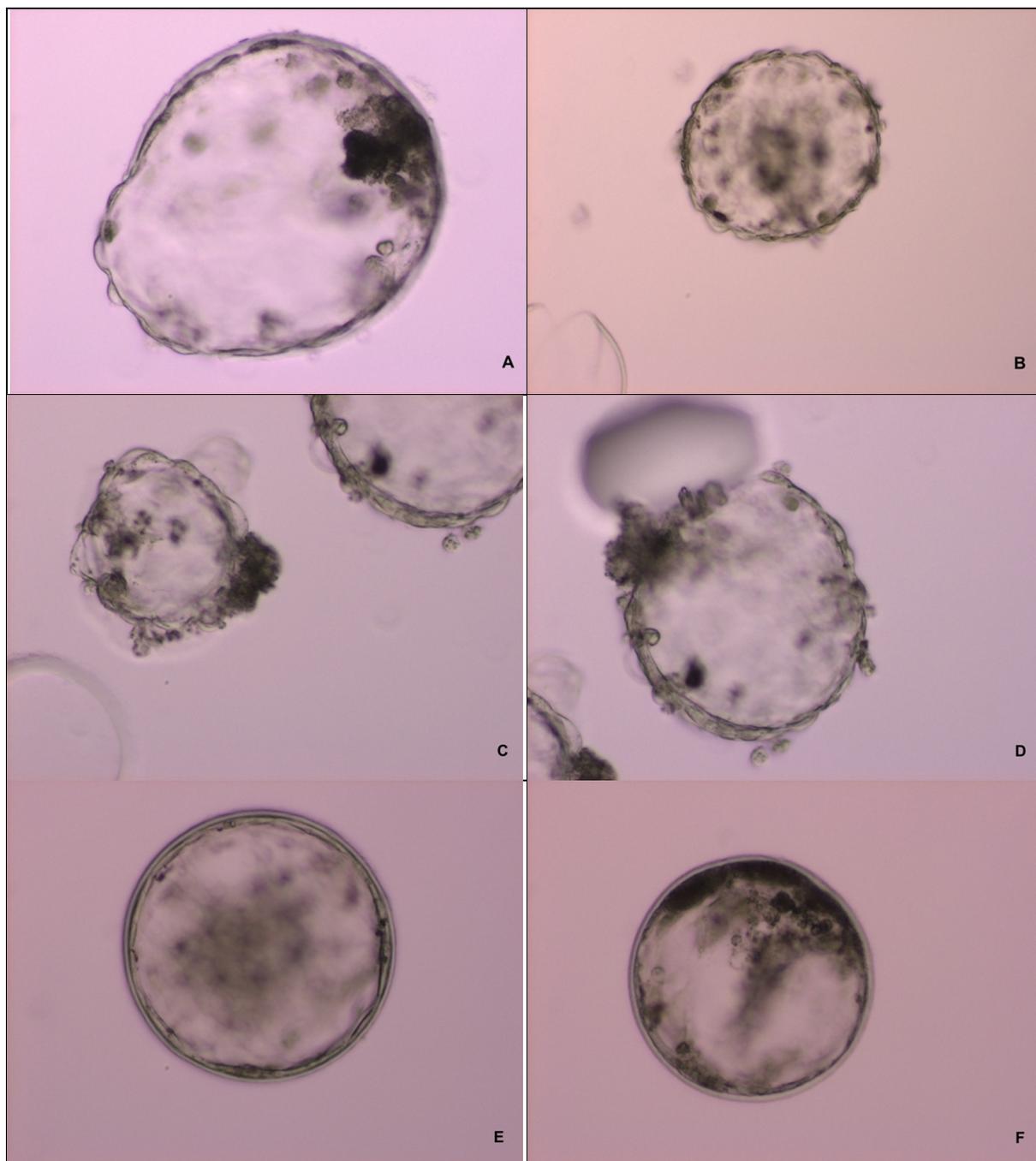
### **3.4. Transferencia de embriones: en fresco y criopreservados**

Durante la pasantía, se hizo selección de receptoras según los criterios descritos. Para ello se realizó US transrectal, revisión de fecha de celo y evaluación de condición corporal. Lo anterior fue llevado a cabo por la pasante, bajo supervisión del médico de

planta. En total se evaluaron 17 animales, de los cuales 13 fueron seleccionados como receptoras. Se rechazaron cuatro animales: dos vacas preñadas y dos sin cuerpo lúteo (CL) por fallo en la detección de celo.

Además, se participó en calidad de asistente en la transferencia de embriones (TE), siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las TE fueron realizadas en fincas asociadas al laboratorio Phönix Repro, con la transferencia de tres embriones en fresco y 10 criopreservados, para un total de 13 TE.

Adicionalmente, la pasante realizó el proceso de descongelamiento de embriones criopreservados de sus rondas de PIV. Esto con el fin de evaluar la tasa de supervivencia de los embriones al proceso de criopreservación. Para esto se descongelaron siete embriones siguiendo el protocolo descrito en la metodología. Luego el contenido de las pajillas fue depositado en una placa Petri con medio de CIV. Posteriormente fueron incubados por 24 horas para evaluar su tasa de supervivencia y desarrollo embrionario. Un total de siete embriones sobrevivieron el proceso de congelamiento y retomaron el desarrollo embrionario, lo que se evidenciaba en el crecimiento y eclosión de los mismos (Figura 8).



**Figura 8.** Embriones post-descongelación e incubación: viables y con reinicio de desarrollo embrionario. A: Blastocisto en proceso de eclosión (8:1); B: Blastocisto totalmente eclosionado (8:1); C y D: Blastocisto eclosionado (8:2); E: Blastocisto expandido (7:1); y F: Blastocisto expandido (7:2).

### **3.5. Otras actividades realizadas**

#### *3.5.1. Ecografía del tracto reproductivo femenino.*

Se tuvo la oportunidad de realizar 98 US. La ecografía tiene muchas funciones, entre esas: diagnóstico de preñez, evaluación de estructuras reproductivas, seguimiento de eventos fisiológicos, entre otros. La pasante realizó US reproductivos para detección de preñez y selección de receptoras, bajo supervisión de los médicos veterinarios a cargo. Adicionalmente, se utilizó US durante los procedimientos OPU, por lo que se practicó de manera observacional durante estas sesiones (n= 51) a cargo del médico de planta.

La ecografía transrectal es una herramienta que ha tomado valor dentro de los avances en reproducción bovina. Esta técnica ha permitido el diagnóstico de preñez temprana por confirmación directa de la presencia de una estructura embrionaria resultando en una disminución del intervalo entre servicios y disminución de los días abiertos. Además, se puede obtener información de la gestación como edad fetal, viabilidad, presencia de gemelos y determinación del sexo. Otro aspecto de importancia es que posibilita la evaluación de los órganos reproductivos y la determinación de patologías ováricas, uterinas, cervicales y vaginales como piómetras, quistes ováricos, endometritis, entre otras. De igual manera, permite hacer un seguimiento de los tratamientos establecidos para estas condiciones. Además, es una técnica no invasiva que ha permitido un mejor entendimiento del funcionamiento del ovario y sus dinámicas foliculares. Esto ha traído grandes avances en técnicas más avanzadas como manipulación hormonal del ciclo estral, selección de receptoras para TE y OPU (Pieterse 1999, Gutiérrez-Lizarazo y Báez Sandoval 2014; Colloton 2015).

### 3.5.2. Estación de colecta de semen RBB.

Durante la visita a la estación de colecta de semen, se participó en las actividades rutinarias del centro. Dentro de lo cual se observó la colecta con vagina artificial de un total de 17 toros. Seguidamente, se realizó el análisis del semen en el laboratorio adyacente a la sala de colecta. Se evaluó volumen, concentración seminal y motilidad progresiva, para la totalidad de las muestras (n=17).

Dentro del protocolo del laboratorio, se monitoreó la estabilidad de la preservación de las muestras por lo que se evaluó la morfología post-descongelamiento en los días siguientes al congelamiento de las pajillas. La pasante realizó el conteo de defectos morfológicos en cuatro muestras, bajo supervisión del médico de planta.

Adicionalmente, se realizó la revisión clínica de dos toros con disminución en calidad de producción seminal, para lo cual se realizó un examen objetivo general y un US testicular. El primer toro presentaba una lesión dermatológica en la base del cuerno izquierdo, por lo que se asoció el menor rendimiento en producción con el estrés asociado a la condición. El segundo toro, presentaba defectos morfológicos significativos en el análisis de sus muestras de semen. En la evaluación de US testicular se diagnosticó degeneración testicular.

Si bien una evaluación del desempeño reproductivo del toro no permite predecir las tasas de preñez, puesto que estas dependen de factores nutricionales, sanitarios y de manejo, sí permite identificar toros subfértiles e infértiles. La subfertilidad del macho se asocia con fallo reproductivo, por semen de mala calidad, bajo volumen o estado de salud del animal. De ahí la importancia de hacer una evaluación integral del

toro antes de incorporarlo a un programa reproductivo, incluyendo un examen clínico, una evaluación del líbido y un estudio de la calidad seminal (Butler et al. 2020; Páez-Barón y Corredor-Camargo 2014).

Siendo así, estaciones de colecta como la de RBB, donde se realiza selección de acuerdo con la evaluación integral, permiten mejorar el desempeño reproductivo de los hatos. Esto a partir de una adecuada selección y manejo de los toros, que incide en un aumento de las tasas de concepción, además de mejorar parámetros productivos por medio de selección de buena genética. Adicionalmente, al aumentar la producción de pajillas de buena calidad, se vuelve más accesible la compra de pajillas de semen para los productores, favoreciendo la diseminación de genes deseables en el hato (Butler et al 2020; Páez-Barón y Corredor-Camargo 2014).

### 3.5.3. *Curso de IA.*

Durante la pasantía se asistió a un curso de IA impartido por el “Instituto de Reproducción de Animales de Granja Schönnow e.V.”. El componente teórico del curso abarcó charlas de fisiología reproductiva básica, diseño de protocolos de inseminación, introducción a los instrumentos de IA, ciclo estral y sistemas de detección de celo, métodos de colecta de semen y manejo del semen para IA.

Dentro del componente práctico se realizaron primeramente prácticas de pasaje de la pistola de IA, tanto en tractos de planta de cosecha como en maniquís de práctica (n=12). Luego, se realizaron prácticas con vacas, para examen rectal, paso de la pistola al útero (n=29) e inspección visual del cérvix con espéculo (n=8). Por último, se utilizó el protocolo de descongelamiento de semen para IA (n=19).

Adicionalmente, se participó de manera observacional en la IA de cuatro vacas donadoras de embriones *in vivo* superovuladas, se realizó de manera práctica la descongelación del semen y se asistió en la IA. Esta fue realizada dos veces en un día a cada vaca, para un total de ocho IA.

En consecuencia, este curso permitió refrescar conocimientos teórico-prácticos de la técnica de IA, lo que es de suma importancia dado que sigue siendo la técnica de reproducción asistida con mayor implementación e impacto en el mejoramiento genético de los hatos a nivel mundial.

#### 4. CONCLUSIONES

4.1. La práctica realizada permitió el desarrollo de destrezas y la obtención de experiencia teórica-práctica en técnicas de reproducción asistida en ganado lechero, las cuales son indispensables para un mejoramiento genético acelerado, aumentando la eficiencia reproductiva bovina.

4.2. Asimismo, se desarrollaron destrezas y se generó conocimiento con respecto a la producción de embriones *in vitro* y OPU a través de la participación observacional, de discusión y práctica en la casuística semanal del laboratorio con vacas comerciales y la producción de ovarios *ex vivo* de planta de cosecha.

4.3. Se asistió en técnicas de producción de embriones *in vivo* y transferencia de embriones en fresco y crio-preservedos y se obtuvo práctica en la criopreservación de gametos masculinos en la visita a la estación de colecta RBB y de embriones, en las rondas de PIV a su cargo y en asistencia en la criopreservación de embriones de vacas comerciales.

4.4. Se obtuvo aprendizaje teórico-practico en programas de IA, con la realización del curso de IA. Además, se reconoció la importancia del uso de US reproductivo y su aplicación en las técnicas de biotecnología reproductiva, así como evaluación de tracto reproductivo, visualización de folículos ováricos, selección de receptoras OPU, entre otras.

4.5. Se discutió ampliamente diversos protocolos hormonales, los cuales se pueden aplicar a sincronización de celo, superovulación y estimulación folicular. Además, se registró la importancia de estos protocolos dentro de las técnicas mencionadas anteriormente.

## 5. RECOMENDACIONES

El uso de biotecnologías reproductivas en Costa Rica requiere de mayor planificación, estudio y acciones que permitan determinar aspectos básicos de selección. Esto debido a que en nuestro país no hay un programa integral de mejoramiento genético a gran escala establecido, y por tanto hay carencia de datos y análisis de los mismos para realizar caracterización reproductiva, como edad al primer parto, intervalo entre partos, entre otros. Esto limita el análisis, progreso genético y productivo que se pueda generar con la aplicación de tecnologías como TE, PIV, IA, etc. Siendo así, se recomienda a las autoridades nacionales, implementar un programa de selección intensiva nacional con un equipo multidisciplinario de expertos para poder aplicar estas tecnologías y predecir una mejoría significativa en el hato nacional a mediano y largo plazo.

Esto traería grandes beneficios para los productores. La reproducción está directamente relacionada con el nivel de producción. La ineficiencia reproductiva es una de las mayores causas de pérdida económica dentro de una finca ganadera.

Una vez que se tenga mapeada la genética presente en el país y las características y puntos por mejorar, la implementación de nuevas tecnologías nos permitiría acercarnos a las metas nacionales e internacionales. Mientras tanto, se puede empezar a pequeña escala con el uso de estas técnicas en fincas junto con una adecuada caracterización y selección interna, acompañada de importación de genes para el mejoramiento genético con el debido monitoreo de resultados.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams G, Singh J. 2011. *Bovine bodyworks: ultrasound imaging of reproductive events in cows*. *WCDS Advances in Dairy Technology* [Internet]. [citado 22 de septiembre 2022]; 23: 239-254. Disponible en: [https://wcds.ualberta.ca/wcds/wpcontent/uploads/sites/57/wcds\\_archive/Archive/2011/Manuscripts/Adams.pdf](https://wcds.ualberta.ca/wcds/wpcontent/uploads/sites/57/wcds_archive/Archive/2011/Manuscripts/Adams.pdf)
- Almela Veracruz L. 2014. Aportaciones a la Crioconservación de Gametos Masculinos de la Raza Bovina Murciano Levantina: Recongelación de Espermatozoides. Universidad de Murcia: Tesis de doctorado. Universidad de Murcia. Disponible en: <https://conocimientoabierto.carm.es/jspui/bitstream/20.500.11914/1005/1/Tesis%20Laura%20Almela%20Veracruz%5B1%5D.pdf>
- Alvarado Malca AE, Gamarra G, Gallegos A, Samillán V. 2016. Tasa de recuperación de ovocitos en vacas Holstein en descarte. *Anales Científicos* [internet]. [Citado 4 de Nov 2023]; 77(1): 63-68. Disponible en: DOI 10.3791/2764
- Bello NM, Stevenson JS, Tempelman RJ. 2012. Invited review: milk production and reproductive performance: modern interdisciplinary insights into and enduring axiom. *J. Dairy Sci.* [Internet]. [citado 10 de septiembre 2022]; 95(10): p 5461-5475. Disponible en: doi:10.3168/jds.2012-5564
- Bertolini M, Bertolini LR. 2009. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. *Rev. Med. Vet. Zoot.* [Internet]. [citado 27 de septiembre 2022]; 56 (3): 184- 194. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4076/407639221004.pdf>

- Bo G, Moreno D, Cutaia L, Caccia M. 2004. Transferencia de embriones a tiempo fijo: Tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. *Taurus*. Vol 21 (4): 25-45.
- Bo GA, Mapletoft RJ. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*. Vol 10 (3): 344-348.
- Bo GA, Mapletoft RJ. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*. Vol 81 (1): 38-48. Disponible en: [10.1016/j.theriogenology.2013.09.020](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020).
- Bo GA, Mapletoft RJ. 2018. Embryo Transfer Technology in Cattle. En: Niemann H, Wrenzycki C, editores. *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies*. Alemania: Springer Cham. p 107-133.
- Bols PEJ, Stout TAE. 2018. Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in Cows and Mares. En: Niemann H, Wrenzycki C, editores. *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies*. Alemania: Springer Cham. p 209-233.
- Butler M, Bormann J, Weabe.r R, Grieger D, Rolf M. 2020. Selection for bull fertility: a review. *Transl Anim Sci* [internet]. [citado 4 de noviembre 2023]; 4 (1): 423-441. Disponible en: [doi: 10.1093/tas/txz174](https://doi.org/10.1093/tas/txz174)

- Cagnone G, Sirard M. 2014. The impact of exposure to serum lipids during *in vitro* culture on the transcriptome of bovine blastocysts. *Theriogenology*. Vol 81(5): 712-722. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.005>
- Callesen H, Bøgh, IB., Greve, T. 2019. *Embryo transfer and other assisted reproductive technologies*. In: Noakes D, Parkinson T, England G, editores. *Veterinary reproduction and obstetrics* [Internet]. 10. ed. Elsevier. p 778–805. Disponible en: [doi:10.1016/b978-0-7020-7233-8.00044-6](https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-7233-8.00044-6)
- Colazo M y Mapletoft R. 2014. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *Can Vet J*. [internet]. [citado 29 de septiembre 2022]; 55(8): 772-780. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432021002190>
- Colloton J. 2015. Chapter 36: Reproductive Ultrasound of Female Cattle. In: Hopper R, ed. *Bovine reproduction*. Wiley Blackwell: John Wiley & Sons, Inc. p. 326-346.
- Do VH, Catt S, Kinder JE, Walton A, Taylor-Robinson AW. 2019. Vitrification of *in vitro*-derived bovine embryos: targeting enhancement of quality by refining technology and standardising procedures. *Reproduction, Fertility and Development* [internet]. [citado 4 de noviembre 2023]; Vol 31 (5): 837-846. Disponible en: <https://doi.org/10.1071/RD18352>
- Dyer T, Graves W. 2017. *Estrous synchronization procedures for beef cattle*. University of Georgia [Internet]. [Citado 9 de septiembre 2022]; Disponible en: [https://secure.caes.uga.edu/extension/publications/files/pdf/B%201232\\_5.PPP](https://secure.caes.uga.edu/extension/publications/files/pdf/B%201232_5.PPP)

- Ferreira E, Vireque A, Adona P, Meirelles F, Ferriani R, Navarro P. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. Vol 71(5): 836-848. Disponible en: [10.1016/j.theriogenology.2008.10.023](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023)
- Filipiak Y, Larocca C. 2012. *Biología en Reproducción Bovina: Manual Teórico-Práctico*. Uruguay (Montevideo): M.E.A.AP. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/230801504\\_Manual\\_de\\_FertilizaciFe\\_In\\_Vitro\\_en\\_Bovinos](https://www.researchgate.net/publication/230801504_Manual_de_FertilizaciFe_In_Vitro_en_Bovinos)
- Fischer B, Bavister BD. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Reproduction*. Vol 99 (2). p 673-679.
- Fricke PM. 2002. Scanning the future-ultrasonography as reproductive management tool for dairy cattle. *J. Dairy Sci* [internet]. [citado 22 de septiembre 2022]; 85: 1918-1926. Disponible en: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(02\)74268-9/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(02)74268-9/pdf)
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R y Lazzari G. 2001. Embryo Production by Ovum Pick Up from Live Donors. *Theriogenology* [internet]. [citado 29 de septiembre 2022]; 55(6): 1341-1357. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/12008018\\_Embryo\\_production\\_by\\_ovum\\_pick\\_up\\_from\\_live\\_donors](https://www.researchgate.net/publication/12008018_Embryo_production_by_ovum_pick_up_from_live_donors)
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* [internet]. [citado 11 de

octubre 2023]; Vol 59 (2): 599-616. Disponible en: doi:10.1016/s0093-691x(02)01243-8

Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo C, Morán E, Facal N, Díez C. 2008. Serum free embryo culture médium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* [internet]. [citado 4 de noviembre 2023]; Vol 69 (8): 1013-1021. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.015>

Gordon I. 2003. Laboratory production of cattle embryos: Biotechnology in Agriculture series. 2da Ed. [internet]. UK (Londres): CABI; [citado: 5 de Agosto 2023]. Disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/sidunalibro-ebooks/detail.action?docID=295061>.

Gutiérrez-Lizarazo D y Báez Sandoval G. 2014. La ultrasonografía en bovinos. Respuestas. Colombia (Cúcuta). Vol 19 (1): 99-106.

Hoshi H. 2003. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*. Vol 59 (2): 675-685. Disponible en DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01247-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01247-5)

[INEC] Instituto Nacional de Estadística y Censo. 2021. Encuesta Nacional Agropecuaria 2020: resultados generales de la actividad ganadera vacuna y porcina. 1 ed. Costa Rica (San José): INEC. p. 27

- Kasimanickam R. 2021a. Chapter 36: artificial insemination. In: Hopper R, ed. Bovine reproduction. Wiley Online Library: John Wiley & Sons, Inc. p. 447-457. Disponible en: doi:10.1002/9781119602484.ch36
- Kasimanickam R. 2021b. Chapter 37: pharmacological intervention of estrous cycles. In: Hopper R, ed. Bovine reproduction. Wiley Online Library: John Wiley & Sons, Inc. p. 458-470. Disponible en: doi:10.1002/9781119602484.ch37
- Klopfenstein J. 2021. Chapter 42: dairy health for optimal reproduction. In: Hopper R, ed. Bovine reproduction. Wiley Online Library: John Wiley & Sons, Inc. p. 517-525. Disponible en: doi: 10.1002/9781119602484.ch42
- Lima FR, Risco, CA., Thatcher MJ, Benzaquen, ME, Archbald LF, Santos JEP, Thatcher WW. 2009. Comparison of reproductive performance in lactating dairy cows bred by natural service or timed artificial insemination. Journal of Dairy Science [Internet]. [citado 10 de septiembre del 2022]; 92(11). 456–5466. Disponible en: doi:10.3168/jds.2009-2197
- Luciano A, Sirard A. 2018. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. Biology of Reproduction [Internet]. [Citado 5 de julio del 2023]; 98(2): 162-169. Disponible en: DOI: 10.1093/biolre/iox149
- Madkar AR, Boro P, Abdullah M. 2021. *Estrus detection methods in dairy-animals and the prospects: a review. agricultural reviews* [Internet]. [citado 26 de septiembre 2022]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/350795441\\_Estrus\\_Detection\\_MethMe t\\_in\\_Dairy\\_Animals-\\_Advances\\_and\\_the\\_Prospects\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/350795441_Estrus_Detection_MethMe t_in_Dairy_Animals-_Advances_and_the_Prospects_A_Review)

- [MAG] Ministerio de Agricultura y Ganadería. 2007. Agrocadena de Leche [Internet]. [citado 18 de septiembre 2022]; MAG, Alajuela, Costa Rica. p 9. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-10453.pdf>
- McGuffey RK, Shirley JE. 2011. History of dairy farming [internet]. Encyclopedia of dairy sciences. [citado 15 de Agosto del 2022]: 2-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1262/jrd.17091>
- Miciaková M, Strapák P, Szabcziová I, Strapáková E, Hanusovsky O. 2018. Several methods of estrus detection in cattle dams: a review. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis [Internet]. [citado 9 de septiembre 2022]; 66(2): 619-625. Disponible en: DOI:10.11118/actaun201866020619
- Moore K, Thatcher WW. 2006. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. journal of dairy science [Internet]. [citado 10 de septiembre 2022]; 89(4): p 1254-1266. Disponible en: doi:10.3168/jds.s0022-0302(06)72194-4
- Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC. 2009. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. Reprod Fertil Dev. 21(4):608–614. 26.
- Morera Jiménez A, Velasco García E, Heras S, Romero Aguirregomezcorta J, Ruíz S. 2022. Respuesta a la estimulación ovárica mediante FSH (FOLLTROPIN®) y rendimiento de OPU en vacas adultas obtenidas por diferentes técnicas de reproducción asistida. Anales de Veterinaria de Murcia. N°36 (2022): 47-64.
- Murillo Ríos A. 2018. Sistema de cultivo para mejorar la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*. Universitat Politecnica de Valencia. Disponible en:

<https://pdfs.semanticscholar.org/7e48/33bf95c7be6194aea7b2c8b62f0f5ef5efa2.pdf>

- Niemann H y Wrenzycki C. 2018. *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies* [internet]. Alemania: Springer Cham; [citado 3 de julio-4 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7>
- Noga N, Looney C. 2021. Chapter 83: embryo transfer and embryo collection. In: Hopper R, ed. *Bovine reproduction*. Wiley Online Library: John Wiley & Sons, Inc. p. 1041-1060. Disponible en: doi: 10.1002/9781119602484.ch83
- Nowicki A. 2021. Embryo transfer as an option to improve fertility in repeat breeder dairy cows. *J Vet Res* [internet]. [citado 9 de septiembre 2022]; 65(2):231-237. Disponible en: doi: 10.2478/jvetres-2021-0018.
- Páez-Barón EM y Corredor-Camargo EM. 2014. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*. 11(2): 49-59.
- Palma G. 2001. *Biología de la Reproducción*. 1ra ed. Argentina: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Palomares R. 2021. Chapter 35: *estrus detection*. In: Hopper R, ed. *Bovine reproduction*. Wiley Online Library: John Wiley & Sons, Inc. p. 431-446. Disponible en: doi: 10.1002/9781119602484.ch35
- Park EJ, Pezzuto JM, Novelle MG, Wahl D, Diéguez C, Bernier M. 2011. Resveratrol: distribution, properties, and perspectives. *J Reprod Dev*. 1852(3):92–99.

- Parkinson T.J y Morrell J.M. 2019. Chapter 43: Artificial Insemination. In: Noakes D, Parkinson T, England G, editores. Veterinary reproduction and obstetrics [Internet]. 10. ed. Elsevier. p 746–777. Disponible en: doi.10.1016/B978-0-7020-7233-8.00043-4.
- Pieterse MC. 1999. El ultrasonido en la reproducción bovina; aplicaciones en diagnóstico y tratamiento. Rev. Taurus. Vol 1(1): 18-26.
- Qi M, Yao Y, Ma H, Wang J, Zhao X, Liu L, Tang X, Zhang L, Zhang S, Sun F. 2013. Transvaginal Ultrasoundguided Ovum Pick-up (OPU) in Cattle. J Biomim Biomater Tissue Eng [internet]. [citado 4 de septiembre 2023]; Vol 18(118). Disponible en doi:10.4172/1662-100X.1000118
- Rodríguez-Almeida F, Ávila-Cota C, Anchondo-Garay A, Sánchez-Ramírez B, Jiménez-Castro J. 2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. Agrociencia: Texcoco [internet]. [citado 20 de septiembre 2023]; Vol 42(4): 399-406. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952008000400002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400002&lng=es&tlng=es).
- Salazar Cartín J. 2019. Introducción a las técnicas de capacitación espermática: un proceso in vitro. Revista Colegio de Microbiología Química Clínica de Costa Rica. 25(1). Disponible en: <http://revista.microbiologos.cr/wp-content/uploads/2019/05/Arti%CC%81culo-2-Introduccion-a-las-Tecnicas-de-Capacitacion-Espermatoca-final.pdf>

Salgado-Cruz E, Lopera-Vásquez R. 2020. Aspectos esenciales sobre las técnicas de fertilización in vitro en bovinos. *Rev. investig. vet. Perú* [Internet]. [citado 9 de septiembre 2022 ]; 31(3): e17138. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172020000300003&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172020000300003&lng=es).

Salverson R y Perry G. 2020. Understanding Estrus Synchronization of Cattle. SDSU Extension [internet]. [citado 29 de septiembre 2022]; South Dakota State University: Animal Science Department. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432021002190>

Sathe S. 2021. Chapter 78: cryopreservation of semen. In: Hopper R, ed. *Bovine reproduction*. Wiley Online Library: John Wiley & Sons, Inc. p. 986-999. Disponible en: doi: 10.1002/9781119602484.ch78

Speckhart S, Wooldridge L, Ealy A. 2022. An updated protocol for in vitro bovine embryo production. *STAR Protoc*. Vol 4(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9758491/> DOI: 10.1016/j.xpro.2022.101924

Thomson s, Homes R, Landes P. 2021. Assessment and selection of the recipient cows' corpus luteum at the time of embryo transfer and its influence on conception rate. *Australian Veterinary Journal*. 99 (7): 288-292. Disponible en: 10.1111/avj.13068

- Turathum B, Gao E-M, Chian R-C. 2021. The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells*. Vol 10(9): 2292. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cells10092292>
- Ugur MR, Saber Abdelrahman A, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E. 2019. Advances in cryopreservation of bull sperm. *Front Vet Sci* [Internet]. [citado 26 de septiembre 2022]; 6: 268. Disponible en: doi: 10.3389/fvets.2019.00268.
- Upadhyay VR, Ramesh V, Dewry RK, Kumar G, Raval K, Patoliya P. 2021. Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: an overview. *Andrología* [Internet]. [citado 26 de septiembre 2022]; 53(8). Disponible en: doi:10.1111/and.14154
- Van Wagendonk-de Leeuw, AM. 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* [Internet]. [citado 9 de septiembre 2022]; 65(5): p 914–925. Disponible en: doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.007
- Vatja G, Kuwayama M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 65 (1): 236-244. Disponible en: DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.026
- Vázquez-Loaiza M, Molina-Coto R. 2021. Métodos de reproducción y parámetros de cebuínos con registro genealógico en Costa Rica. *Agronomy Mesoamerican* [Internet]. [citado 11 de septiembre 2022]; 32(1). p 19-33. Disponible en: doi:10.15517/am.v32i1.40130

- Viguera B, Watler W, Morales M. 2018. Ficha técnica para sistemas productivos con ganado bovino. CATIE, Cartago, Costa Rica. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/L01-8412.pdf>
- Webb D.W. 1992. Artificial insemination in dairy cattle [Internet]. Florida, Gainesville: University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, Eds; [citado 8 de septiembre 2022]. Disponible en: <http://aradina.kenanaonline.com/files/0066/66728/5.pdf>
- Xu Z. 2011. *Control of estrous cycles: synchronization of estrous cycles*. In: Fuquay J, ed. Reproduction, events and management [Internet]. Encyclopedia of dairy sciences. p 448-453. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00452-0>
- YanéZ-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil J, Miró J, y Yeste M. 2021. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science* [internet]. [citado 29 de septiembre 2022]; 106904. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432021002190>
- Youngs C. 2011. Cryopreservation of Preimplantation Embryos of Cattle, Sheep, and Goats. *J Vis Exp*. 1 (54). Disponible en: DOI 10.3791/2764.
- Marc S, Godja G, Milovanov C, Tulcan C, Cernescu H, Otava G, Bonca G, Ciobota A, Hutu I, Mircu C. 2014. Morphological aspects of cumulus oocyte complexes in different species. *Lucrări tiințifice - Medicină Veterinară, Universitatea de Științe*

Agricole și Medicină Veterinară "Ion Ionescu de la Brad" Iași 2014 .57 No. 3/4 pp.

91-97. DOI: 10.13140/RG.2.2.12668.49280