

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL USO DE DETERMINADOS SEMENTALES Y DONADORAS DE OVOCITOS, EN PROGRAMAS DE PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES (REPORTE PRELIMINAR)

SOME CONSIDERATIONS IN THE USE OF CERTAIN BULLS AND OOCYTE DONORS ON IN VITRO EMBRYO PRODUCTION PROGRAMS (PRELIMINAR REPORT)

*Reinaldo De Armas**. Universidad de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Zootecnia. Panamá. reinaldo.dearmas@up.ac.pa. <https://orcid.org/0000-0003-2488-0113>

Sergio Villamil. Gerente General Hacienda Ecos del Porvenir. Chiriquí. Panamá. ecosdelporvenir@gmail.com

Carlos F. Marins. Gerente General Gertec Embriones. Panamá. caisbarreiro@hotmail.com

Alex Solis. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia. Panamá. alex.solis@up.ac.pa. <https://orcid.org/0000-0002-1764-2654>

Reggie Guerra. Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Zootecnia. Panamá. reggie.guerra@up.ac.pa. <https://orcid.org/0000-0001-8471-2862>

*Correo de Correspondencia: reinaldo.dearmas@up.ac.pa

Recibido: 21/02/2023

Aceptado: 10/04/2023

RESUMEN. Con el objetivo de evaluar algunos índices de eficiencia en programas de producción y transferencia de embriones bovinos in vitro, se compararon los resultados alcanzados en 9 donantes de ovocitos y nueve toros empleados para la fertilización in vitro (FIV), de los mismos. En ambos casos se estableció un orden decreciente en referencia a los resultados de preñez logrados con los embriones producidos. Los resultados por Donadora se movieron entre un 81.3% y 28.6% con un promedio de 50.8%. Mientras que por Toros fue de 63.6% a 16.7% con un promedio de 44.3%. Al evaluar los toros empleados se apreció que los 3 que mostraron los peores resultados de preñez coincidieron en ser, los que menor cantidad de embriones divididos y transferibles aportaron (Toro 7: 25, 39.1 y 14.1%; T8: 22.2, 14.3 y 8.9%; T9: 16.7, 31.1 y 5.4% respectivamente). Al emplear la mejor donadora con los peores tres toros, solamente se logró en promedio un 45% de división, 8.3 de embriones transferibles y 14.3% de preñez, mientras que al ser evaluadas las mejores cuatro donadoras fertilizadas con el mejor toro (Toro: 1), los resultados fueron de 54.8% de preñez, 70.6% de división y un 34.4% de los divididos alcanzaron la categoría de transferibles. De estos resultados se puede inferir la importancia del toro en la FIV, quien aparentemente posee mayor influencia que la donadora. No obstante, hay donadoras que generan poca cantidad de embriones transferibles, pero en contraste sus embriones aportan altos índices de preñez (>60%). Basándonos en estas observaciones recomendamos realizar ensayos de producción de embriones con ovarios de matadero para validar la eficiencia del toro antes de los programas de producción de embriones por aspiración folicular en hembras de alto valor genético ya que, aunque un toro posea altos índices de preñez en inseminación artificial, puede no tener el mismo comportamiento en FIV. Por otra parte, en las donadoras que aportan bajos porcentajes de división post inseminación o pocos transferibles, se deberán de aspirar mayor número de folículos para incrementar el número de ovocitos para FIV.

PALABRAS CLAVE: donadora de ovocitos, FIV, embriones divididos, transferibles, transferencia.

ABSTRACT. In order to evaluate some efficiency indices on in vitro bovine embryo production and transfer programs, the results achieved in 9 oocyte donors and nine bulls used for in vitro fertilization (IVF) were compared. In both cases, a decreasing order was established in reference to the pregnancy results achieved with the embryos produced. The results per donor moved between 81.3% and 28.6% with an average of 50.8%. While for Bulls it went from 63.6% to 16.7% with an average of 44.3%. When evaluating the bulls used, it was observed that the 3 that showed the worst pregnancy results coincided in being the ones that contributed the least amount of cleaved and transferable embryos (Bull 7: 25, 39.1 and 14.1%; T8: 22.2, 14.3 and 8.9% ; T9: 16.7, 31.1 and 5.4% respectively). When using the best donor with the worst three bulls, only an average of 45% division, 8.3 transferable embryos and 14.3% pregnancy were achieved, while when evaluating the best four donors fertilized with the best bull (Bull: 1), the results were 54.8% pregnancy, 70.6% cleavage and 34.4% of those cleaved reached the transferable category. From these results it can be inferred the importance of the bull in IVF, who apparently has a greater influence than the donor. However, there are donors who generate a small number of transferable embryos, but in contrast their embryos provide high pregnancy rates (>60%). Based on these observations, we recommend carrying out embryo production trials with slaughterhouse ovaries to validate the bull's efficiency before embryo production programs by follicular aspiration in females of high genetic value, since even though a bull has high pregnancy rates in artificial insemination, may not have the same behavior in IVF. On the other hand, in donors who provide low post-insemination division percentages or few transferable ones, a greater number of follicles should be aspirated to increase the number of oocytes for IVF.

KEYWORDS: oocyte donor, IVF, cleaved embryos, transferable, transfer.

INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 60 se conoce, que los ovarios de las hembras bovinas están capacitados para producir cientos de miles de ovocitos durante su vida reproductiva; sin embargo, el número de crías que se obtienen es muchísimo menor (Palma, 2008). La transferencia de embriones permite obtener un mayor rendimiento, de la producción ovárica de esas hembras. En la década de los 80 y principios de los años 90 numerosos fueron los estudios que se realizaron para conseguir que hembras de alta calidad genética, ovularán ovocitos después de un tratamiento hormonal (hiperestimulación ovárica o superovulación), se las inseminara con semen de un macho también de alta calidad genética y se lograra su fertilización de forma consistente y repetida (de Armas 2013 a).

Como es conocido la vaca es un animal uníparo lo que implica que libera en cada ciclo estral un solo óvulo que debe ser fecundado y desarrollado hasta el parto. Cada ciclo estral posee una duración promedio de 21 días, mientras que el nivel de fertilización de los óvulos es de aproximadamente del 80% y los porcentajes de recuperación por las técnicas no quirúrgicas disponibles aseguran solo entre un 60 y 80% de los embriones presentes en el útero (Palma, 2008). Con estos resultados solo podríamos obtener 10 embriones aptos para la transferencia al año y tendríamos que realizar 17 colectas a cada donadora, lo cual resultaría un trabajo muy difícil en la práctica (Palma 2008). De acuerdo con De Armas (2012) lo anteriormente planteado sumado a los altos costos en insumos, la imposibilidad de predicción de la respuesta y baja repetibilidad de los resultados ha ido disminuyendo en la práctica cotidiana, la producción de embriones por superovulación.

Como describe De Armas (2013 b), la aplicación de los procedimientos de producción de embriones por fertilización in vitro (FIV) en la reproducción bovina se ha incrementado en los últimos años y se emplean en programas de gran escala de producción comercial de embriones in vitro como publicó Viana (2022). Dentro de este concepto, la recolección de ovocitos es un paso necesario para poder llegar a establecer estos programas de FIV, pero la ventaja de poder ser realizada post mortem a partir de ovarios obtenidos en el matadero o en animales in vivo, con la ayuda de la aspiración folicular asistida por ecografía de forma reiterada y con alta repetibilidad en los resultados, ha influido en el incremento de su popularidad (Solis, 2017). Para poder producir embriones in vitro, primero debemos de obtener los ovocitos y luego conseguir la maduración de los mismos, la capacitación del semen que vamos a utilizar para fecundar, la fecundación y después el cultivo de los embriones obtenidos, hasta estadios transferibles (Rivera, 2013).

A pesar de que hay resultados de fertilidad disponibles en inseminación artificial de acuerdo con los toros que aportan el semen según Schneider *et al.*(1999) y Al Naib.*et al.* (2011); esto no indica que se puedan emplear exitosamente en el proceso de FIV por lo que no es una regla aplicable, ya que los mejores toros en IA no siempre son los que mayores índices de producción de embriones

o resultados de gestación aportan en la FIV tal como plantearon Palma y Sinowatz (2004). Sobre este tema se han realizado pocas investigaciones a nivel internacional (Ward *et al* 2001, Akyol *et al* 2014) y en Panamá no hay precedentes sobre este tema (Guerra *et al* 2013).

Los costos del empleo de las técnicas de producción de embriones resultan relativamente altos en cualquiera de los métodos que se empleen. No obstante, en el caso de la producción in vitro de embriones (PIVE), el gasto inicial de inversión de los laboratorios es el mayor y este es amortizado a un mediano plazo. Lógicamente en la medida que se produzcan más embriones por ciclo de FIV se abaratan los costos de producción y la recuperación de la inversión inicial sería más rápido y esto indirectamente abarataría los precios que deben pagar los productores por embrión producido al Laboratorio.

Como planteamos anteriormente la disminución de los costos por embrión producido están condicionados a la mayor generación de embriones que sean capaces de proveer altos índices de gestación. Por tal razón sin lugar a duda, para que nuestros productores puedan aprovechar esta poderosa herramienta de mejoramiento genético, los precios actuales por embrión producido deben de ser menos onerosos.

Evidentemente, fuera de las variantes en la técnica de PIVE empleadas o del tratamiento de procesamiento de los ovocitos o del semen, los medios y las condiciones de cultivo, los factores inherentes a las capacidades de los ovocitos de madurar, ser fertilizados y desarrollarse en embriones viables capaces de culminar en una gestación, están conectados directamente a la hembra que los donó (Moce y Graham 2008, Palma 2008, Ward *et al.* 2001). Pero por otra parte nos resulta imposible de ignorar la responsabilidad del semen empleado en la fertilización, influido lógicamente por el toro que lo generó. Estos conocimientos pudieran a su vez ayudar predecir los resultados esperados y hacer más eficiente la explotación de esta técnica según Sen (2015).

Por las razones anteriormente expuestas el poder valorar la importancia del papel que poseen ambos integrantes del proceso de PIVE, pudiera resultar en una garantía para incrementar los resultados de producción de embriones y gestaciones que lograría una intensificación en el uso de esta técnica en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue desarrollado con la colaboración de la Hacienda Ecos del Porvenir situada en Cantagallo, Distrito de Alanje, en la Provincia de Chiriquí, la cual facilitó las donadoras de ovocitos, el semen empleado y las receptoras utilizadas en la transferencia de los embriones producidos.

En todos los casos la aspiración folicular y los procedimientos de PIVE fueron desarrollados por el mismo personal y bajo el mismo procedimiento de rutina del Laboratorio de FIV de la Empresa GERTEC, Panamá.

La selección de las receptoras, la transferencia de los embriones y el diagnóstico de gestación se desarrollaron por el mismo operador del Centro de Investigaciones en Biotecnologías Agropecuarias (CIBA), de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá.

Se evaluaron los resultados en producción de embriones durante dos meses consecutivos de trabajo (Septiembre y Octubre) y porcentajes de gestación logrados. Se emplearon 9 vacas donadoras de ovocitos de la raza Brahman entre 7 y 16 años y semen congelado en glicerol - yema de huevo, en pajillas de 0.5ml en centrales de IA certificadas en Estados Unidos, de 9 toros de la raza Brahman.

Los embriones producidos fueron transferidos en hembras de cruces lecheros (Pardo Suizo x Brahman), en el estadio de blastocisto luego de 7 días de la fertilización de los ovocitos colectados por aspiración folicular en las hembras donadoras. La sincronización de las hembras receptoras se inició un día antes de la colecta de los ovocitos en las hembras donadoras y consistió en la colocación de dispositivos intravaginales liberadores de progesterona + 2cc de benzoato de estradiol el día de inicio de tratamiento, 7 días más tarde se realizó el retiro del dispositivo, acompañado de la aplicación intramuscular de 2 cc de un análogo sintético de PGF2 α + 1 cc Cipionato de Estradiol + 330 UI de Gonadotropina Coriónica Equina. La transferencia de los embriones se realizó por la técnica no quirúrgica en las hembras sincronizadas a tiempo fijo (9 días después del retiro de los dispositivos intravaginales), previo diagnóstico de un cuerpo lúteo en uno de sus ovarios por vía transrectal, auxiliado por un ecógrafo para ginecología veterinaria.

El diagnóstico de gestación se practicó a los 45 días de la transferencia por palpación transrectal y confirmado por ecografía. Se evaluaron los resultados de ovocitos colectados, aptos para la fertilización in vitro, divididos post fertilización, aptos para la transferencia y gestaciones logradas. El análisis estadístico de estos registros se realizó empleando un análisis de comparación de proporciones Chi cuadrado a un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede apreciar en la Tabla 1 dentro de los toros estudiados se destacaron 2 toros que lograron altos rendimientos en división en cultivo (1 y 4) y a la vez también coincidieron en altos porcentajes en la producción de embriones transferibles lo que concuerda con lo publicado por autores como Eyestone y First (1989), Shi *et al.* (1990). y Sen (2015). Sin embargo, en los resultados de preñez debido a la diferencia en cuanto a la cantidad de transferencias realizadas por toros no se evidenció estadísticamente posibles diferencias. Del análisis estadístico se pudo apreciar

diferencias entre el toro 1 y el 8 para el parámetro de división con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Estos fueron los valores calculados de R-Square: 0.313381, Coef Var: 28.12784, Root MSE: 14.56937, Mean: 51.79697 para división embrionaria. Mientras que para la producción de embriones transferibles no se evidenciaron diferencias estadísticas y valores calculados de R-Square: 0.288232, Coef Var: 61.48926, Root MSE: 17.00271, Mean: 27.65152. En este estudio las desviaciones estándar fueron muy grandes por el poco número de réplicas en algunos toros, razón por la cual no se logran establecer diferencias estadísticas entre muchos de ellos, lo que fue debido a la selección en el uso de estos para la FIV o para ser transferidos por parte del propietario de la finca, lo que respondió al interés de este, de acuerdo con su programa de mejoramiento genético, sobre el cuál nuestro estudio no pudo hacer variaciones.

Tabla 1. Resultados por toro referente a la división en cultivo, producción de embriones transferibles y porcentaje de preñeces.

TORO	Ovocitos	Divididos		Transferibles		Transferido	Preñez	
	FIV	n.	%	n.	%	s	n.	%
1	276	174	63.0 ^a	119	43.1	33	21	63.6
2	85	39	45.9 ^{ab}	23	27.1	16	8	50.0
3	195	88	45.1 ^{ab}	23	11.8	13	6	46.2
4	166	97	58.4 ^{ab}	70	42.2	15	6	40.0
5	49	26	53. ^{ab}	12	24.5	11	4	36.4
6	98	42	42.9 ^{ab}	15	15.3	15	5	33.3
7	64	25	39.1 ^{ab}	9	14.1	4	1	25.0
8	146	52	14.3 ^b	13	8.9	9	2	22.2
9	111	35	31.1 ^{ab}	6	5.4	6	1	16.7
Totales	1190	578	48.6	290	24.4	122	54	44.3

Nota. Letras desiguales en la misma columna muestran diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

El mismo fenómeno afectó el análisis estadístico de la influencia de las hembras donadoras de ovocitos sobre los resultados de división en cultivo, transferibles (aptos para la TE) y porcentajes de preñez como sugirió Uribe *et al.* (2011). Sin embargo, si estudiamos los resultados solamente desde un punto de vista matemático, podemos encontrar que no hay grandes diferencias entre los porcentajes de ovocitos aptos para la FIV en referencia a la cantidad de ovocitos aportados por donadora, ni entre los porcentajes de división en cultivo (Tabla 2), a diferencia en los porcentajes de embriones aptos para la transferencia, donde hay resultados como en el caso de la donadora A (9.9%) vs la G (40.9%). Esta diferencia pudo haberse debido a la edad de las donadoras, en coincidencia con lo mencionado por diferentes autores (Tammassia *et al.* 2003, Baruselli *et al.* 2021, Nogueira *et al.* 2021) ya que la vaca A tenía 16 años vs la G con 7 años, los que han descrito a esta variable como una de las que más influyen en los resultados de la producción de embriones aptos para la transferencia.

Tabla 2. Resultados por donadora

Donadora	Edades	Ov. colectados	Aptos para FIV		Divididos		Aptos para TE		Transferencias	
			n.	%	n.	%	Prop.	%	Prop.	% Preñez
A	16	307	233	75.9	102	43.8	23/233	9.9	13/16	81.3
B	9	131	84	64.1	51	60.7	25/84	29.8	6/9	66.7
C	15	148	114	77.0	39	34.2	22/114	19.3	3/5	60.3
D	8	136	104	76.5	54	51.9	40/104	38.5	14/24	58.3
E	9	109	79	72.5	42	57.5	19/79	22.9	7/14	50.0
F	14	305	232	68.5	98	42.2	42/232	18.1	9/20	45.0
G	7	193	154	79.8	88	57.1	63/154	40.9	5/15	33.3
H	10	116	103	88.8	62	60.2	35/103	34.0	3/9	33.3
I	17	210	162	77.1	74	45.7	21/162	13.0	4/14	28.6
Totales		1655	1269	76.7	651	51.3	290/1269	22.9	64/126	50.8

En referencia a los resultados de gestación alcanzados, la gran diferencia entre la cantidad de transferencias realizadas por donadoras no permitió su análisis estadístico, aun así, los porcentajes logrados son satisfactorios, correspondiéndose con los publicados internacionalmente (Baruselli *et al.* 2016 y 2021, Park *et al.* 2021).

Tabla 3. Resultados al trabajar las mejores donadoras con el mejor toro

Don.	Toro	Ovocitos Colectados	Aptos para FIV/Divididos		Transferibles		% Preñez	
			Prop.	%	Prop.	%	Prop.	%
A	1	46	31/22	54.6	2/22	9.1	1/2	50.0
B	1	50	28/45	62.2	17/45	33.3	8/14	57.1
C	1	60	25/51	49.0	9/51	17.7	1/2	50.0
D	1	64	31/45	68.9	28/45	80.0	7/13	53.9
		220	115/163	70.6	56/163	34.4	17/31	54.8

Tabla 4. Resultados de la mejor donadora con los peores toros

Don.	Toro	Ovoc. en FIV	Emb. en FIV		Transferibles		% Preñez	
			Divididos	%	Prop.	%	Prop.	%
A	7	55	13/55	23.6	2/55	3.6	0/2	0%
	8	10	0/10	---	0/10	---	---	---
	9	58	38/58	65.5	9/58	15.5	1/5	25%
			51/123	41.5	11/123	8.9		14.3%

Tabla 5. Resultados de la peor donadora con los peores toros

Don	Toro	E. div	%	M	Bt	Bl	Bx	Be	Viab.	%	TE	%
I	8	14/28	50.0	2	3	3	0	0	8/28	21.4	1/3	33.3
I	9	11/27	40.7	0	2	1	0	0	3/27	11.1	0/3	---

Por otra parte, no coincidimos con lo publicado por Tamassia *et al* (2003) quienes encontraron que tanto las mejores y peores donadoras siempre fueron las mismas independientemente del semen empleado para la FIV. Como se puede apreciar en las tablas 3, 4, 5, donde al emplear la mejor donadora con los mejores toros se lograron altos resultados y lo contrario ocurrió al utilizar el semen de los peores toros con las mejores donadoras y como era de esperar si tomábamos la peor donadora con los peores toros, obtuvimos los más bajos resultados. Estos hallazgos están de acuerdo con lo planteado por Palma y Sinowatz en (2004) quienes observaron grandes diferencias entre toros referente a su capacidad de producir embriones.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El toro empleado en la FIV mostró mayor influencia que la donadora en los resultados de la PIVE.
2. La hembra donadora también evidenció efectos en los resultados de PIVE.

Basándonos en nuestros resultados recomendamos realizar ensayos de producción de embriones con ovarios de matadero para validar la eficiencia del toro antes de iniciar los programas de producción de embriones por aspiración folicular en hembras de alto valor genético, ya que, aunque un toro posea altos índices de preñez en inseminación artificial, puede no tener el mismo comportamiento en FIV.

Por otra parte, en las donadoras que aportan bajos porcentajes de división post inseminación o pocos transferibles, se deberán de aspirar mayor número de folículos para incrementar el número de ovocitos para FIV al volver a realizarse aspiración folicular.

Recomendamos hacer un estudio con más cantidad de repeticiones por animales, tanto donantes como semen de toros y tratar de uniformar las cantidades de transferencias para llegar a resultados más precisos.

REFERENCIAS

- Akyol, N., Kizil, H., Satılmış, M., Karaşahin, T. (2014). Investigation of Bull Effect on in vitro Embryo Production. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 20(4), 561-564.<https://www.researchgate.net/publication/269813689> Investigation of Bull Effect on in vitro Embryo Production
- Al Naib, A., Hanrahan, J.P., Lonergan, P., Fair, S. (2011). In vitro assesment of sperm from bulls of high and low fertility. *Theriogenology.* 76 (1), 161- 167.

- Baruselli, P.S., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Ferreira, R.M., Gu, B.G. (2016). Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Anim. Reprod.* 13 (3), 264-272.
- Baruselli, P.S., Rodrigues, C.A., Ferreira, R.M., Sales, J.N.S., Elliff, F.M., Silva, L.G., Viziack, M.P., Factor, L., D'Occhio, M.J. (2021). Impact of oocyte donor age and breed on *in vitro* embryo production in cattle, and relationship of dairy and beef embryo recipients on pregnancy and the subsequent performance of offspring: A review. *Reprod Fertil Dev.* 34(2), 36-51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35231233/>
- De Armas, R. (2012). Transferencia de embriones y su aceptación en la ganadería panameña. *Revista Investigación Agropecuaria*. Ed: FCA-UP. 1(1), 11-15.
- De Armas, R. (2013). a. Algunos resultados obtenidos en la superovulación y transferencia de embriones bovinos en Panamá. *Revista Investigación Agropecuaria*. Ed: FCA-UP. 1(2), 1-13
- De Armas, R. (2013). b. Influencia de la biotecnología animal como instrumento de innovación para el mejoramiento ganadero en Panamá. *Revista Investigación Agropecuaria*. Ed: FCA-UP. 1(2), 14-34
- Eyestone, W.H., First, N.L. (1989). Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. *Theriogenology*, 31 (1), 191.
- Guerra, R., Solis, A., De Armas, R. y García Yasmín. (2013). Validación de la prueba de unión de espermatozoides a zonas pelúcidas in vitro para estimar la aptitud fecundante de eyaculados de toros de la raza Holstein. *Revista Investigación Agropecuaria*. Ed: FCA-UP. 1(2), 35-44.
- Hillery, F.L., Parrish, J.J., First, N.L. (1990). Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology*. 33 (1), 249.
- Moce, E., Graham, J.K. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci*, 105 (1): 104-118.
- Nogueira, B. G. R., Souza, L. F. A. de Puelker, R. Z., Giometti, I. C., Firetti, S. M. G., Dias, T. S. dos S. B., & Castilho, C. (2021). Factors affecting the in vitro production of bovine embryos in a commercial program. *Research, Society and Development*, 10(2), e16110212264. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12264>
- Palma, G.A. (2008). *Biotecnología De La Reproducción*, 2º Edición. Ed: Reprobiootec, Buenos Aires, Argentina. p 280.
- Palma, G.A. and Sinowatz, F. (2004). Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anat Histol Embryol*, 33(5), 257-62.
- Park, Y. S., Kong, J. H., Yi, J. K., Oh, D. yep, & Chung, K. H. (2021). Effects of donors and in vivo ovum pick-up conditions on in vitro embryo development in Korean native cow.

- Korean Journal of Veterinary Service. The Korean Society of Veterinary Service.
<https://doi.org/10.7853/kjvs.2021.44.4.227>
- Rivera, M.G. (2013). Fertilización in vitro. Manual de biotecnología reproductiva en bovinos.
<http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com/p/fert.html>
- Schneider, C.S., Ellington, J.E., Wright, Jr R.W. (1999). Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. *Theriogenology*, 51 (6), 1085-1098.
- Sen, U. (2015). Effects of sperm from different bulls on developmental competence, blastosist quality and cell number of bovine embryos in vitro. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21, 339-344.
https://www.researchgate.net/publication/282313348_Effects_of_sperm_from_different_bulls_on_developmental_competence_blastosist_quality_and_cell_number_of_bovine_embryos_in_vitro
- Shi, D.S., Lu, K.H., Gordon, I. (1990). Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology*, 33 (1): 324.
- Solis, A. (2017). Dinámica folicular, colecta de ovocitos y producción de embriones in vitro en novillas de la raza fleckvieh en zona tropical de sabana. (Tesis de Doctorado), La Habana: Editorial Universitaria, 2017 – e-ISBN 978-959-16-3502-0.
[http://Dinamica%20folicular,%20colecta%20de%20-%20Solis%20Corrales,%20Alex%20\(Autor\)%3B%20D%20\(1\).pdf](http://Dinamica%20folicular,%20colecta%20de%20-%20Solis%20Corrales,%20Alex%20(Autor)%3B%20D%20(1).pdf)
- Tammassia, M., Heyman, Y., Lavergne, Y., Richard, C., Gelin, V., Renard, J.P, Chastant-Maillard, S. (2003). Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development in vitro. *Reproduction*, 126 (5), 629-637,23.
- Uribe, R., Mora, Juliana., Ramírez, Daniela. (2011). Influencia de la subespecie de la donadora en la cantidad de embriones totales obtenidos in vitro: estudio retrospectivo. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6(2), 45-52.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072011000200005&lng=en&tlng=es
- Viana, J.H.M. (2022). A new milestone has been reached: Transfers of IVP embryos were over one million worldwide. *Embryo Technology Newsletter*, 40 (4), 22-40.
- Ward, F., Rizos, D., Corridan, D., Quinn,K., Boland,M. and Lonergan, P. (2001). Paternal Influence on the Time of First Embryonic Cleavage Post Insemination and the Implications for Subsequent Bovine Embryo Development In Vitro and Fertility In Vivo. *Molecular Reproduction and Development*, 60(1), 47-55.