

**Formación en producción *in vitro* de embriones y
biotecnologías reproductivas aplicadas al
mejoramiento genético de los hatos ganaderos en
Antioquia**

Estudiante

Julissa Andrea Ramírez Orozco

Director(es)

Erika Yamile Herrera

Codirector(es)

Diana Milena Maturana

Trabajo de Grado

En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Biología

Universidad CES

Medellín

Octubre 2020

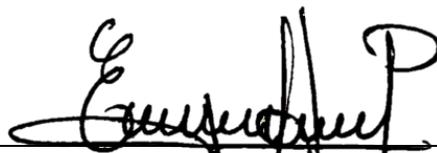
13 de octubre de 2020.

Se informa que el estudiante **Julissa Andrea Ramírez Orozco** identificado con cédula: No. 1039472493 ha concluido de manera satisfactoria su trabajo de grado titulado **Biotecnología reproductiva aplicada al mejoramiento de la genética de los hatos ganaderos en Antioquia** en la modalidad de *Pasantía*.

En calidad de **director(es)** del trabajo de grado en mención, y luego de haber revisado con detalle y alto rigor científico y académico el presente documento final, se aprueba este Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de **Biólogo**.



Tutor: Diana Maturana
Cédula: 1128282677
Afiliación: Laboratorio Vitrolab
S.AS



Tutor enlace: Erika Herrera
Cédula: 42160484
Afiliación: BioEmbrio FIV SAS

Formación en producción *in vitro* de embriones y biotecnologías reproductivas aplicadas al mejoramiento genético de los hatos ganaderos en Antioquia

Julissa Andrea Ramírez Orozco

Resumen

La producción de embriones *in vitro* actualmente ha cobrado importancia en el sector ganadero por ser una técnica que ayuda a la mejora genética y eficiencia en la producción. En Colombia la producción *in vitro* de embriones bovinos se ha ido posicionando como una de las biotecnologías reproductivas con la que se han logrado avances significativos a nivel de productividad, calidad y eficiencia reproductiva. Esta técnica requiere la obtención y maduración de ovocitos y su posterior fertilización en condiciones de laboratorio, por lo que requiere personal altamente calificado que garanticen y obtengan una mayor cantidad y calidad de embriones. Finalizado este periodo los embriones serán transferidos a una receptora o criopreservarlos en termos de nitrógeno líquido hasta su transferencia en otro momento.

Por lo tanto, la producción *in vitro* de embriones promueve la evaluación eficiente de la capacidad fertilizante de espermatozoides y ovocitos, ayuda a la difusión del uso de semen valioso y escaso y a el control de enfermedades de la esfera reproductiva, entre otras.

El presente trabajo es una selección de información que busca despertar el interés sobre esta técnica, adquirir conocimientos y socializar para que en el futuro se difundan ampliamente y se aplique como una herramienta de mejora genética.

Palabras clave: Ovocitos, maduración, fertilización, cultivo, criopreservación, transferencia.

TABLA DE CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN.....	5
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN.....	5
3. OBJETIVOS.....	5
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
4. LOGROS ALCANZADOS.....	6
5. DIFICULTADES.....	6
6. RESULTADOS.....	7
6.1. ADQUISICIÓN DE EXPERIENCIA.....	7
7. CONCLUSIONES.....	16
8. RECOMENDACIONES.....	17
9. BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. Presentación

Mi proceso de pasantía inició en enero del año 2020 en las instalaciones del laboratorio Vitrolab S.A.S en la ciudad de Medellín, gracias al apoyo y confianza por parte de mi tutor enlace Erika herrera y a mi tutora Diana Maturana quien estuvo a mi pendiente en el laboratorio durante todo el proceso de la pasantía. Dentro del laboratorio logre afianzar mis habilidades y conocimientos sobre la técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos logrando entonces una mayor capacidad y confianza a la hora de desarrollar la técnica. Con lo anterior se espera aportar al sector biotecnológico con personal altamente calificado en técnicas de alto impacto y que la experiencia y el conocimiento generado puedan ser aplicado a otras áreas como la conservación de la biodiversidad y la salud.

2. Reseña de la institución

El laboratorio Vitrolab S.A.S está ubicado en la ciudad de Medellín, Antioquia, este trabaja en la producción *in vitro*, vitrificación y congelación de embriones bovinos y de búfalos, en asociación con Ge3 - Biotecnología Animal. Este es un grupo interdisciplinario de profesionales que se une con la finalidad de prestar los servicios de biotecnología animal y asesorías en el sector administrativo y de manejo de producciones pecuarias.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Adquirir conocimiento y habilidades técnicas para la producción *in vitro* y criopreservación de embriones bovinos.

3.2 Objetivos específicos

- Aprender a seleccionar ovocitos bovinos aptos para maduración *in vitro* siguiendo criterios de calidad estándar.
- Desarrollar habilidades para la selección espermática y fertilización *in vitro*.
- Identificar los factores determinantes en un cultivo embrionario *in vitro*.
- Desarrollar competencias básicas en criopreservación de embriones bovinos.

4. Logros alcanzados

Se logró cumplir con todos los objetivos planteados en el cronograma, ya que fue posible pasar por todos los espacios del laboratorio asignados para el desarrollo de las actividades en el cronograma, que iban desde la búsqueda, selección y clasificación de los ovocitos aptos para la maduración, administración de los fluidos seminales para la fertilización, protocolos para los cultivos embrionarios hasta el manejo de las técnicas para criopreservación de embriones. La pasantía se realizó desde el 27 de enero hasta el 19 de marzo de 2020, con una asistencia aproximada de 7 horas diarias. Inicialmente se planteó que su duración fuese de 4 meses y medio, pero dada la contingencia por la pandemia del coronavirus se dio por finalizada cumpliendo las 240h estipuladas en la ley.

5. Dificultades

Durante el periodo de pasantía se presentaron los siguientes inconvenientes: Contingencia Sanitaria Nacional y aplicación de medidas de distanciamiento social y cuarentena obligatoria que dio inicio el 25 de marzo de 2020. **Estas medidas requirieron la** evaluación anticipada de los cumplimientos de los objetivos, **los cuales fueron aprobados con la salvedad de que la experiencia pudo ser mayor.**

6.Resultados

6.1 Adquisición de experiencia

Durante el transcurso de la pasantía se logró adquirir conocimiento en todos los procesos que conlleva la producción *in vitro* de embriones bovinos, que van desde la maduración *in vitro* de los ovocitos (MIV) obtenidos de ovarios por medio de aspiración o punción folicular, la fertilización *in vitro* (FIV) de los ovocitos madurados, el cultivo *in vitro* de los embriones hasta la criopreservación de los mismos, cada uno de los pasos mencionados es un punto vital para el éxito del proceso.

La pasantía inicio con la capacitación en la selección de ovocitos que estuvieran aptos para ser madurados en condiciones *in vitro*. En este método se realiza la recolección de ovarios a partir de hembras sacrificadas en plantas de beneficio para ser sometidos al proceso de aspiración folicular, la cual proporciona grandes cantidades de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo embrionario. El transporte de los ovarios se lleva a cabo en un termo con agua en la que se mantengan a una temperatura entre 35-37°C con el objetivo de que lleguen en buen estado hasta el laboratorio (1).

Una vez en el laboratorio, los ovarios serán lavados con solución salina fisiológica estéril para remover contaminantes. Cada ovario es secado suavemente con papel toalla estéril, y los ovocitos serán recuperados desde folículos de 2 a 8 mm. La aspiración de ovocitos es realizada con una jeringa para 5 a 10 ml unida a una aguja 18 para evitar el daño de las células del cúmulus que lo rodean (2).

Los ovocitos obtenidos serán posteriormente seleccionados bajo lupa estereoscópica (x30), conservando aquellos que presenten varias capas compactas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo (grado 1-2) (3).

Tipo	No. Células cúmulus	Citoplasma
1 =Excelente	Capas múltiples, compactas de células (cuatro o más)	Homogéneo y transparente
2 =Bueno	Capas múltiples de células de cúmulus (entre una y tres)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
3 =Regular	Denudados	Irregular con zonas oscuras
4 =Malo	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

Tabla 1. Categoría de complejos cúmulus-ovocitos (CCO'S) para procedimientos de PIVE (Lindner y Wright 1983).

Luego del llenado de tubos de 50ml conteniendo fluido folicular(ovocitos),los complejos cúmulus-ovocito se decantan y forman un pellet en el fondo del tubo, el

cual será recolectado con pipeta Pasteur y se colocaran sobre una placa de búsqueda con medio de Lavagem, el propósito de este lavado será la eliminación del fluido folicular que vehiculiza los ovocitos, así como posibles contaminantes provenientes de la sala de punción(3). Posterior a esto se procede a buscar los ovocitos la cual debe realizarse lo más rápido posible para prevenir los efectos adversos del enfriamiento(2).

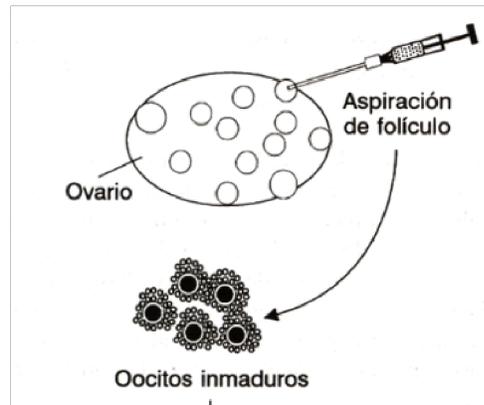


Figura 1. Esquema de aspiración de ovarios por punción folicular (Restrepo,2008)

Una vez lavados y seleccionados, serán posteriormente colocados en grupos de 30 ovocitos por cada placa de cultivo, conteniendo medio de maduración. El medio de maduración usado en el proceso es el Tissue Culture Medium-199 (TMC 199) con sales Earle's, suplementado con Suero Fetal Bovino (SBF) al 10%, FSH, LH, piruvato, amikacina y Estradiol que tiene un efecto favorable en el desarrollo post maduración (1), este medio es el más ampliamente usado para MIV en ganado y búfalos. La preparación de cajas Petri de medio de maduración se realiza con microgotas de 30 μ l de medio, cubiertas con aproximadamente 3 ml de aceite mineral y se incuban a 38,5 °C, 5% de CO₂ y a una humedad a saturación durante un tiempo aproximado de 20-24 horas para luego poder ser fecundados (2,3).

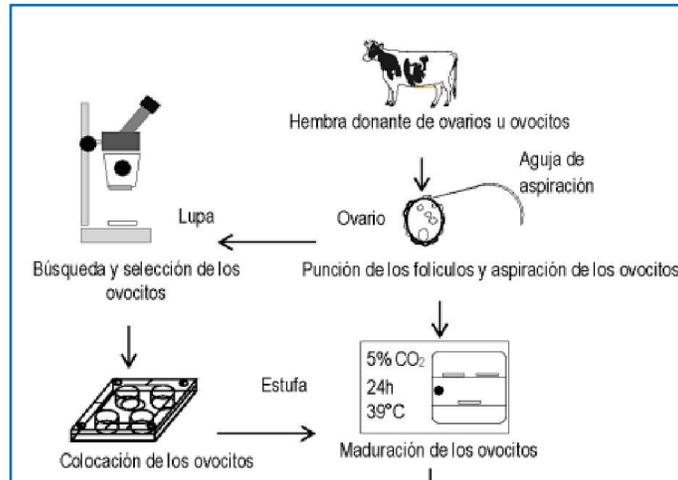


Figura 2. Esquema de producción *in vitro* de embriones (PIVE) bovinos (Palma, 2008)

Para efectuar la fecundación *In Vitro* se utilizan muestras de semen congelado del toro programado con la donadora (4). Si el semen está congelado en pajillas en N₂ líquido, la misma deberá descongelarse en un baño maría a 37°C, durante 30 segundos. Posteriormente, una vez secada la pajilla se efectuará el corte de uno de sus extremos y se lo introducirá en una bolsa plástica estéril y luego se efectuará el corte del otro extremo y se descargará de este modo la columna de semen dentro de la bolsa estéril anteriormente mencionada(1).

El semen a utilizar se prepara mediante la técnica de gradiente de Percoll para remover el plasma seminal, el diluyente y obtener espermatozoides móviles (4). Dentro del laboratorio el gradiente de Percoll se preparaba en un microtubo de 2 ml en el cual se introducían 100 µl de Percoll al 90%, luego 50 µl de medio FIV y por último 50 µl más de Percoll al 90%, posteriormente se procedía a introducir el semen del toro previamente seleccionado dentro del gradiente para luego centrifugarlo por 5 minutos a 9000 Rpm si era convencional o 1000 Rpm si era sexado. Luego con una pipeta de 1000 µl se decantaba suavemente el semen muerto y los fluidos que se encontraban en la parte superior del microtubo, dejando en el fondo los espermatozoides vivos al cual se le agregaran 20 µl de medio FIV para centrifugarlo nuevamente por 3 minutos a 4,5 Rpm para asegurarse de que los espermatozoides queden libres de Percoll pues este es tóxico para ellos si se deja por tiempos prolongados. Por último se quita el exceso de medio FIV que se agregó anteriormente y se dejan los espermatozoides solos en el microtubo hasta cuando se vayan a fecundar los ovocitos.

Previamente los ovocitos deben ser lavados en gotas que contengan medio FIV para quitarles el exceso de medio MIV en el que se encontraban. Las placas para la fertilización en el laboratorio se preparaban utilizando 20 µl de medio FIV por cada gota, luego se agrega en la placa 2000 µl de aceite mineral y por último se le agregaban

50 μl de aceite mineral a cada gota desde arriba, con el objetivo de que la gota se hiciera más grande para proteger a los ovocitos que están adentro.

Finalmente fertilizo los ovocitos con el semen ya capacitado, las cantidades de semen que se agregan a cada gota dependen del semen utilizado, pues si se trata de semen convencional la cantidad de semen pueden variar entre 5-10 μl , mientras que si el semen es sexado lo recomendable es empezar a fertilizar con una cantidad de 10 μl ya que este semen en estas condiciones está muy diluido y no rinde en el proceso de la fertilización (se necesita mayor volumen). Para facilitar la penetración espermática en la FIV, los ovocitos previamente son desnudados de células del cúmulus. Los ovocitos junto a los espermatozoides son dejados en la incubadora entre 12 y 22 horas en un ambiente de 5% CO_2 , 38.9°C de temperatura, y humedad a saturación (2).

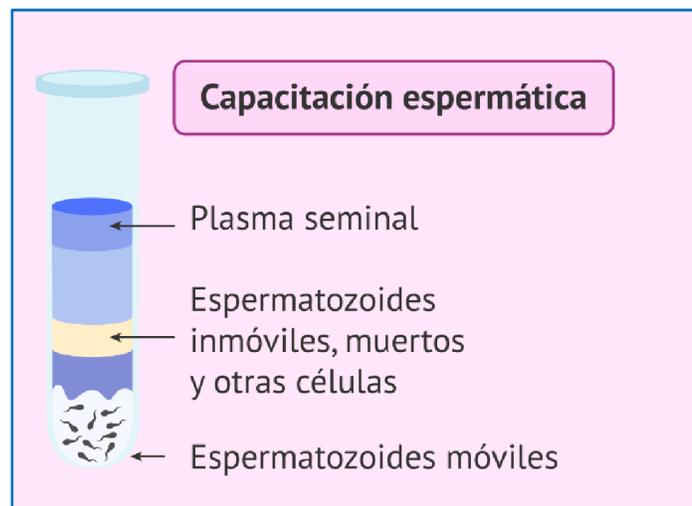


Figura3. Capacitación espermática por gradientes de densidad (Reproducción asistida ORG, 2018)

Aquellos cigotos de 4 o más células resultantes de la FIV son cambiados del medio de fecundación a un medio de cultivo embrionario (SOF) donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta llegar a mórulas y blastocistos (3). El CIV se realiza preparando gotas de medio de desarrollo SOF (Fluido sintético del oviducto) de 70 μl , 2000 μl de aceite mineral sobre la placa y 2000 μl del mismo sobre cada gota del medio SOF donde se encuentran los embriones. Durante el CIV lo fundamental es remover toda clase de desechos metabólicos provenientes de la fase anterior, así como también espermatozoides muertos, y células de la granulosa mediante pipeteos suaves para no maltratar los embriones. El objetivo de la remoción de todos estos desechos en especial las células de la granulosa es para evitar la competencia que se genera entre las células del cúmulus y el embrión ya que estas ejercen presión sobre el embrión y frenan el desarrollo embrionario. El cultivo de embriones es realizado en una incubadora con aire humidificado, con 5% CO_2 a 38°C por 24 horas (2).

Aproximadamente el 80% de los ovocitos quedan fertilizados y clivan hasta el estado de dos células después de MIV, FIV, y de estos solo llegan el 40% de los embriones al estado de blastocisto después de CIV (21). El cultivo embrionario corresponde al paso más prolongado dentro del proceso, es el periodo que determina la eficiencia global del sistema, así como la calidad de los embriones obtenidos (3).

La observación de la tasa de clivaje es realizada aproximadamente 32 horas después del inicio del CIV, aquí se realiza un feeding en el cual se cambia y agrega medio SOF nuevo y se observa el total de embriones que hay y los que clivaron con más de 4 células (Día 3) **Figura 4**. Pasados dos días se cambia y se agrega nuevamente medio SOF sobre las placas de cultivo y se observan los embriones y mórulas que se tienen para tener una predicción de más o menos cuantos embriones se pueden empacar para transferir al día siguiente (Día 6-7). **Figura 5**

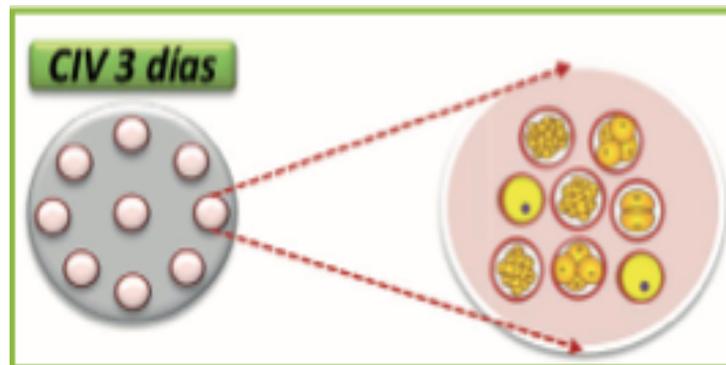


Figura 4. Diagrama de células a las 72 horas de cultivo.

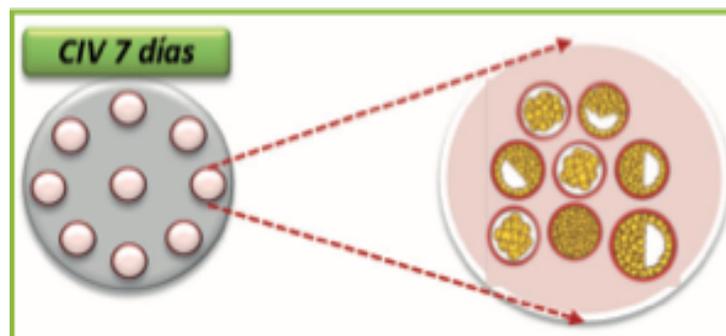


Figura 5. Diagrama de embriones el día 7 de cultivo.

Para clasificar la morfología de los embriones bovinos, la IETS (International Embryo Technology Society) establece 4 categorías numéricas, la primera pertenece a aquel embrión en excelentes condiciones, pues su masa embrionaria es esférica y simétrica,

y las células del blastómero son uniformes (tamaño, color y densidad), la superficie de la zona pelúcida debe ser lisa y sin anomalías y por lo menos el 85% del material celular debe estar intacto y viable. La segunda categoría refleja un embrión con forma irregular moderada refiriéndose a la apariencia de la forma, color, tamaño y por supuesto la densidad de las células y solo al rededor del 50% del material celular tendrá que estar intacto y se ajustará a una masa embrionaria viable. La tercera clasificación presenta mayores irregularidades, tiene una menor masa embrionaria, y al menos el 25% del material celular será viable e intacto. En la cuarta categoría se considera un embrión no son viable. Sólo los embriones 1 y 2 se toman en cuenta para la transferencia (BX y BL) (1).

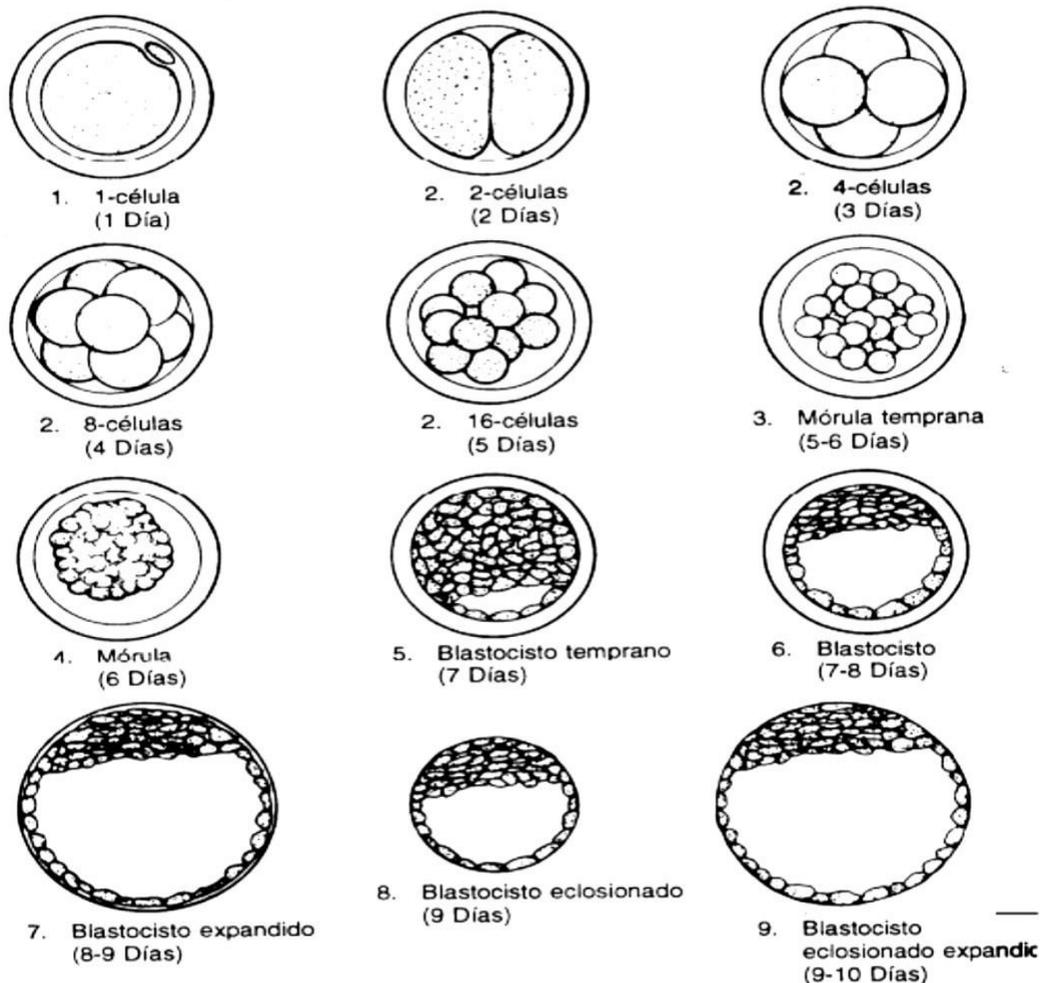


Figura 6. Clasificación de los embriones según normas IETS. (De la Fuente, 2012)

Para la transferencia de los embriones (TE) se necesitan pajillas para empacar los embriones, lacrados para marcar cada pajilla y una transportadora con una temperatura entre 36-37°C para llevar los embriones hasta el lugar de la transferencia hacia las vacas receptoras. Para llenar las pajillas se usa una jeringa, la cual se le adhiere la pajilla donde va a estar el embrión. Para llenarla, primero se llena de solución de aceite mineral, luego un espacio de aire; en el siguiente espacio deberá ir

el embrión en la solución (porción media de la pajilla), seguido de un espacio de aire y al final de solución de aceite mineral(5).

De esta manera el embrión queda situado en el segmento central de la pajuela entre las dos burbujas de aire. El aire que se le adhiere a la pajilla es para que al momento de transferir el embrión no se quede en la pajilla y salga sin ningún problema. Al finalizar el llenado se debe sellar la pajilla al extremo donde no se encuentra el algodón dentro de la pajilla con un lacrador y su respectiva identificación (registrar el estadio y la calidad embrionaria, y los datos de los padres) (5).

Los embriones que no serán transportados muchas veces son sometidos a un proceso denominado criopreservación, una biotécnica que posibilita mediante la utilización de bajas temperaturas, almacenar embriones de una amplia variedad de especies mamíferas sin que pierdan su capacidad de desarrollar y nacer vivos. Actualmente los métodos más utilizados para criopreservar embriones son la congelación convencional y la vitrificación (3).

El congelamiento convencional tiene una ventaja comparativa frente a los otros métodos de criopreservación, al ser una metodología que permite la utilización de bajas concentraciones de crioprotectores y permite la transferencia directa de los embriones después de la descongelación. Sin embargo, su habilidad para prevenir la formación de hielo intracelular aún es limitada, además, los resultados *in vitro* de la criopreservación de embriones han sido variables y menores en comparación a los datos obtenidos en embriones *in vivo* (6).

El proceso que se requiere para llevar a cabo la congelación convencional es el siguiente:

1.Exposición de los embriones a las soluciones de congelación
2.Envasado de los embriones en pajillas de 0,25ml
3.Enfriamiento inicial en una maquina Criobath hasta llegar a -6°C
4.Introducción de la cristalización o “seeding”
5.Descenso térmico lento y descenso térmico rápido controlado. De este modo se alcanza, junto con el descenso térmico lento, una formación controlada de cristales de hielo
6.Almacenamiento de N2 liquido en contenedores de N2 liquido a -196°C.

Tabla2.Protocolo para la congelación convencional de embriones bovinos

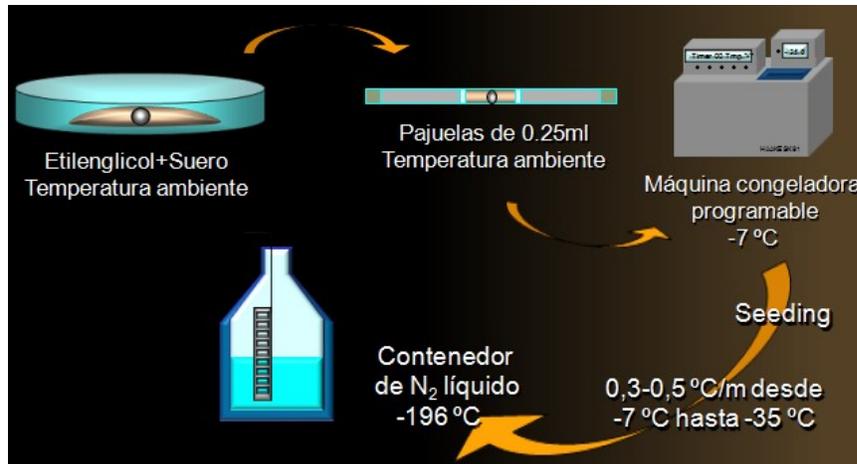


Figura 7. Protocolo general de congelación de embriones. (Mucci. N.)

La vitrificación corresponde a una técnica de congelación ultrarrápida basada en el contacto directo entre la solución de vitrificación que contiene agentes crioprotectores, y ovocitos o embriones con el nitrógeno líquido, produciéndose una solidificación para formar un estado vítreo o similar a cristal, sin ninguna formación de cristales de hielo durante el enfriamiento a tasas muy rápidas y permaneciendo en este estado durante todo el proceso de cambio de temperatura (2).

El uso de la técnica “Open Pulled Straw” (Pajilla abierta y estirada), ha permitido aumentar la velocidad de los cambios de temperatura, lo cual ofrece ciertas ventajas para la congelación, como son la disminución de las concentraciones de los crioprotectores utilizados, con los consecuentes menores efectos osmóticos y tóxicos, además del paso más rápido por la zona de temperatura peligrosa, lo que produce menores daños por enfriamiento (2). La técnica OPS de vitrificación permite las velocidades de enfriamiento más rápidas, del orden de 20.000 °C/min, lo cual es posible gracias al reducido volumen vitrificado (2µl), que permite que los embriones u ovocitos sean introducidos a la pajilla por capilaridad. Son utilizadas pajillas clásicas de 0.25 ml, las cuales son estiradas. El sistema OPS acelera el tiempo de congelación y descongelación hasta 10 veces sobre pajillas convencionales. La vitrificación por OPS es un método rápido y efectivo para críopreservar embriones bovinos (2).

<p>1. Los soportes de 0,25ml de capacidad serán calentados sobre una platina térmica y estirados manualmente hasta que su diámetro y pared disminuyan, posteriormente se procederá a realizar su identificación</p>
<p>2. Preparación de medio para vitrificar la cual esta formulada con una combinación de crioprotectores (penetrantes y no penetrantes), un soporte líquido (PBS) y macromoléculas (suero, BSA)</p>
<p>3. Introducción de los embriones en el medio de vitrificación durante algunos minutos y luego pasarlos a el soporte. Este proceso debe efectuarse en un total de 30 segundos</p>
<p>4. Cumplidos los 30 segundos los soportes serán sumergidas en N2 líquido rápidamente (-196°C)</p>

Tabla3. Protocolo de vitrificación- Técnica Open Pulled Straw(OPS)

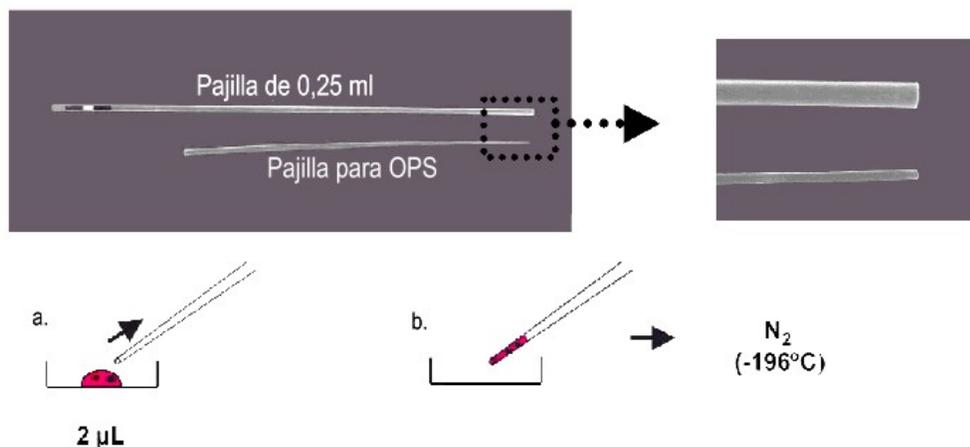


Figura 8. Open pulled straw (OPS), pajilla de 0,25 ml. Adaptado de Guignot (2005).
a) Gota de 2 µl de crioprotector con los embriones u ovocitos. b) Montaje de la gota por capilaridad en la pajilla y su paso directo al nitrógeno líquido.

En Colombia se ha intensificado el uso de la transferencia de embriones en los últimos 18 años, con cifras que duplican la cantidad de transferencias realizadas en la década de los años 90 situación que refleja la tendencia de la TE en el mundo (7).

7. Conclusiones

La ganadería colombiana ha mostrado avances importantes durante los últimos años, aumentado gradualmente su nivel de tecnificación con el apoyo de diversas entidades que han facilitado importantes logros en aspectos como el sanitario, transferencia tecnológica y de modernización de los procesos de sacrificio y transformación de carnes y leche, entre otros (8). Esto sumado al empuje de los ganaderos y de sus instituciones ha logrado importantes avances en el mejoramiento genético y rendimientos de producción. La producción *in vitro* de embriones (PIVE) ha abierto las puertas a la posibilidad de obtener un alto número de embriones bovinos aprovechando de manera más eficiente la genética del macho y la hembra en comparación con otras técnicas (1). La PIVE bovinos ofrece la posibilidad de obtener embriones pre-implantatorios a bajo costo para ser utilizados con fines académicos y/o comerciales (3).

Según la IETS la producción de embriones *in vitro* en 2017 alcanzo casi un millón de embriones producidos (992.289), lo que representa un récord mundial. Para este año la IETS logro recopilar datos de varios países con industrias conocidas de embriones activos, pero que no presentaron datos en años anteriores, especialmente en América del Sur. Algunos de ellos, como Colombia y Paraguay, reportaron un alto número de embriones de PIV (24.503 y 26.044, respectivamente), contribuyendo significativamente al aumento del total de PIV mundial, lo que refleja el esfuerzo de las diferentes entidades colombianas, dando a entender que se va por buen camino frente al proceso que brinda esta nueva tecnología (9).

No obstante, este ritmo de transformación no es suficiente frente a los retos apremiantes de la globalización y, por lo tanto, es necesario acelerar al proceso de modernización de la ganadería colombiana utilizando herramientas biotecnológicas y de manejo zootécnico(8).

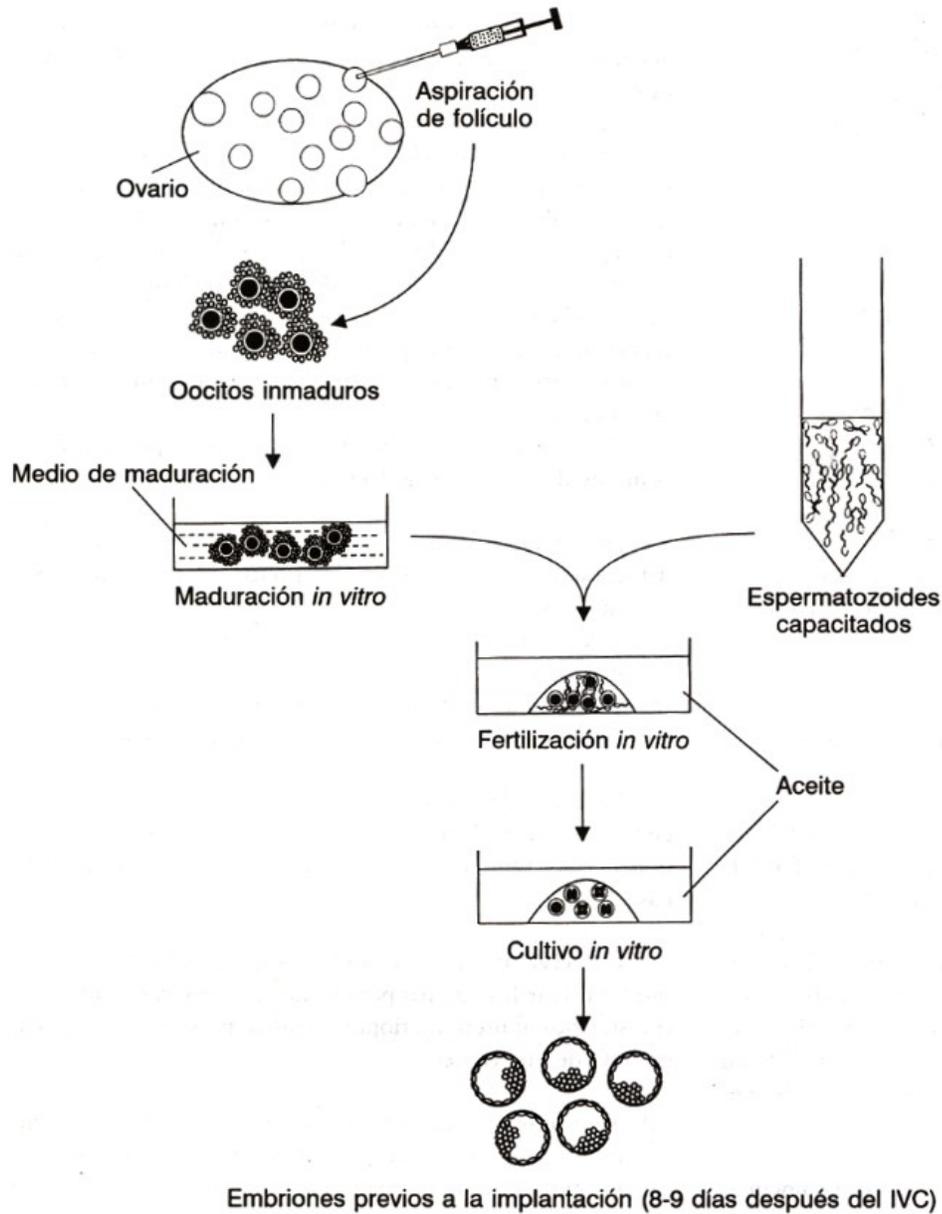


Figura 9. Procedimiento de PIVE. (Restrepo,2008)

8.Recomendaciones

Recomendaría a los estudiantes interesados en esta pasantía que no matriculen otras asignaturas o como máximo una sola pues una pasantía requiere mucho tiempo y esfuerzo y lo ideal sería estar centrado solo en las actividades de la pasantía para poder aprender y disfrutar al máximo todo el proceso de práctica.

9. Bibliografía

1. Moreno, D. Estado actual, proyecciones y perspectivas de la fertilización in vitro (FIV) en la ganadería bovina en Colombia.. [Internet]. 2018. [citado: 2019, noviembre] Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/21321>
2. Restrepo G. Biotecnologías Reproductivas Aplicables a la Producción Bovina en Colombia. 2008.
3. Peláez Peláez VA. Producción in vitro de embriones bovinos.pdf [Internet]. 2011 [citado 12 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
4. Puerta Gómez LFP. Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular (OPU) y fecundación in vitro (FIV) como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras cebuinas dentro del plan de modernización del Hato Gana [Internet]. 2006. Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1134&context=zootecnia>
5. César OBJ. Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. 2007;56.
6. Rodríguez P, Jiménez C. Criopreservación de embriones bovinos producidos in vitro. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 1 de mayo de 2011;58(2):107-19.
7. Bolívar PA, Estrada JGM. Análisis de costos de esquemas de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2008;21(3):351-64.
8. Fedegan. Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana 2019. [Internet]. [citado 4 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.fedegan.org.co/plan-estrategico-de-la-ganaderia-colombiana-2019>
9. Embryo Technology Newsletter [Internet]. International Embryo Technology Society; 2018 dic. Report No.: Volume 36, Number 4. Disponible en: https://www.iets.org/pdf/newsletter/dec18_iets_newsletter.pdf