

## Capítulo LXVI

### Logros, desafíos y claves de la producción *in vitro* de embriones (PIVE)

Hugo Hernández Fonseca

La historia muchas veces no tiene el brillo de lo novedoso pero es una de las formas más efectivas de apreciar los logros. También es preciso entender que la historia se repite, de formas diversas en diferentes espacios (países) y en diversos tiempos, muchas veces cometándose los mismos errores y guiando los aciertos.

El 9 de junio de 1981 un equipo de investigadores de la Universidad de Pennsylvania logró el nacimiento de “Virgil”, el primer becerro *in vitro* del mundo (Brackett *et al.*, 1982). A pesar de lo significativo de tal logro, para el momento la aplicación a gran escala de esta tecnología presentaba grandísimos desafíos que solo pudieron vencerse más de una década después. Entre tales limitaciones (desafíos del pasado) se contaban:

- Ausencia de un medio que sustentara, en forma confiable la maduración del ovulo, la fusión de los gametos y el desarrollo embrionario más allá de un embrión de 8 células. Si tomamos como ejemplo a “Virgil”, este becerro fue producto de la transferencia de un embrión logrado luego de fecundar *in vitro* un óvulo madurado *in vivo* y transferido de 4 células a nivel de oviducto (método quirúrgico) en una receptora (Penny). Hoy día solo se transfieren por métodos no quirúrgicos mórulas o blastocistos (168 horas o 7 días luego de la fecundación).
- Lo inconveniente de la obtención de ovocitos ovulados y alojados en el oviducto o a través de la aspiración folicular a través de métodos quirúrgicos (laparotomía “de pie”), obtención que hoy día se realiza en menos de 10 minutos por aspiración transvaginal y con medias de ovocitos por sesión de aspiración que con frecuencia superan los 15 óvulos viables.

Sin embargo y a pesar de estas y otras dificultades se había acumulado una buena cantidad de información científica (logros del pasado) que incidiría en el progreso que esta tecnología ha experimentado y que garantizan su vigencia. Ejemplos de estos conocimientos los enumeramos y describimos brevemente a continuación:

- Se conoció la importancia que en la composición de los medios de maduración ovocitaria tenían compuestos hormonales como los Estrógenos ( $E_2$ ) y las gonadotropinas (LH y FSH), compuestos estos importantísimos en los medios de cultivo actuales. La inclusión de FSH mejoro la fecundación ulterior de los ovocitos madurados en estos medios.
- Se estableció la importancia de la incorporación del calcio en la capacitación y reacción acrosómica que sufre el espermatozoide, y que la exposición de las células espermáticas a soluciones hipertónicas podían iniciar estos procesos.
- Se identificó a la poliespermia como un suceso mucho más frecuente en el cultivo *in vitro* que bajo condiciones fisiológicas o naturales, lo cual condujo al diseño de estrategias y medios que simularan lo mejor posible las condiciones *in vivo*. Esto con el fin de mejorar la interacción de los gametos (fecundación).
- Se determinó que la presencia de células del cumulus era favorable durante la FIV, y que moléculas como la epinefrina y la hipotaurina eran en alguna manera favorables durante este proceso de interacción entre gametos. Al igual que los  $E_2$  y las gonadotropinas en los medios de maduración, la epinefrina y la hipotaurina son elementos obligatorios hoy día en los medios de FIV.

Como se ve, es mucho lo que se ha avanzado desde el parto de la vaca “Penny” que dio origen al primer becerro *in vitro* del mundo, en medio de un ambiente de investigadores universitarios en 1981. Este logro represento años después (2004) para el investigador principal del proyecto (Dr. Benjamin Brackett) el Premio “Pioneers Award” de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria (IETS).

## LOGROS EN VENEZUELA

### Los primeros nacimientos

El primer becerro *in vitro* reportado en el país nace en la Hacienda El Placer (Inversora Ganadera Santa Elena del Sr. Rafael Pirela) en el Municipio Villa del Rosario de Perijá del Estado Zulia. Este primer producto, conocido como “Chinco”, nace el 18 de noviembre del año 2000 (Socorro C, 2006) y la primera becerra por semen sexado producida y nacida en Venezuela (“Eva”) nace el día 3 de Julio de 2007 en la Agropecuaria El Paraíso del Estado Apure). Hoy día la tasa de nacimientos mensuales debe ser cuantificada, pero debo rondar los 200 nacimientos.

### Crecimiento de la infraestructura: laboratorios comerciales

Otros importantes logros como la creación del primer laboratorio de Fecundación In Vitro (FIV) se presenta en el año 2005 en la Universidad Centro Occidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), al cual siguen los de la Universidad del Zulia y la Universidad Central de Venezuela. Finalmente el primer laboratorio comercial de FIV (franquicia de Vitrogen Brasil) abre sus puertas en el año 2006. Hoy día existen en Venezuela 4 laboratorios comerciales (Embrioven (Valera, estado Trujillo), Viateca (Km 104 de Perijá, estado Zulia), División Genética de Ganadería Doble A (Hacienda El Ceibote, Perijá, estado Zulia), Genética In Vitro (Cabudare, estado Lara), Embrio-

tec de Venezuela (Maracaibo, estado Zulia) y uno adicional pronto a ser inaugurado en el Estado Mérida (Genética y Embriones Mérida). Cada una de estas empresas con diferentes características, estrategias y alcances.

Los laboratorios FIV de investigación, que fueron los primeros en crearse entre el año 2005 y 2007 (UCLA, LUZ y UCV) no han crecido en número, pero sin duda han contribuido al nacimiento de los laboratorios comerciales.

### **Personal especializado venezolano**

Según mis aproximaciones personales en Venezuela existen más de 20 profesionales formados a nivel técnico y/o de postgrado y una cantidad equivalente realizando entrenamientos o tesis de postgrado en biotecnologías reproductivas de FIV-OPU (del Inglés “ovum pick up” que significa aspiración transvaginal de ovocitos).

Los laboratorios de investigación tienen como su principal objetivo la producción de conocimiento científico, el soporte a los programas de postgrado y la formación de personal especializado e investigadores de alto nivel en biotecnologías reproductivas, con dominio de la parte técnica así como de los conceptos y procesos moleculares y fisiológicos involucrados en el área de la embriología. La existencia de estos laboratorios universitarios contribuye a la formación de recurso humano que luego puede continuar su formación profesional en los laboratorios comerciales y sin duda existe potencial para que la academia y la empresa privada sigan encontrándose en asociaciones como la creación de una sociedad venezolana de biotecnologías reproductivas.

### **Número de ovocitos por sesión OPU**

En nuestro país, ya se han reportado buenas tasas de preñez, acompañadas de tasas de aspiración de óvulos (OPU; González-Fernández & Sánchez-Villasmil, 2012) coincidentes con reportes de otras partes del mundo (Hernández-Fonseca *et al.*, 2002; Pontes *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2011). El promedio de ovocitos por sesión de OPU alcanzan promedios superiores a 20 ovocitos/sesión y hasta 6 embriones/ciclo OPU-FIV en aspiraciones repetidas (González-Fernández y Sánchez-Villasmil, 2012; Hernández-Fonseca *et al.*, data no publicada). Estos mismos reportes o comunicaciones personales de empresas privadas destacan medias por animal que superan los 40 ovocitos en 4 a 5 sesiones seguidas (Gutiérrez, 2013) y picos de recuperación de casi 80 ovocitos por sesión de aspiración (Hernández-Fonseca, 2014, data no publicada).

### **Tasas de preñez**

De los pocos porcentajes de preñez publicados en el país, destacan algunos que se acercan al 30% (28,6%, 68/238; González-Fernández & Sánchez-Villasmil). Cifras similares han sido encontradas por nuestro grupo (24,7%; 22/89) y otras cifras aún superiores han sido destacadas por empresas privadas. Datos recientes aun no publicados del autor alcanzaron un porcentaje de preñez de un 50% (8/19) en novillas mestizas Carora en época de verano, sin embargo estos resultados aún están siendo analizados.

Trabajando con ovocitos provenientes de mautas y novillas Gir Lechero (Donadoras) y sin considerar el mestizaje, edad, tipo de celo o estatus fisiológico (novillas o

vacas) de las receptoras, hemos encontrado una tasa de preñez de un 42.1 % (16/38; Hernández-Fonseca, data no publicada). En el mismo trabajo los ovocitos provenientes de vacas (secas y en producción) arrojan cifras muy inferiores (15,2%, 7/46). Por supuesto esta data necesita ser ampliada, pero pone de manifiesto que la calidad de los ovulos y las condiciones de los animales donadores sin duda juegan un papel importante en la calidad del embrión y el resultado de preñez. Resultados destacados (superiores al 70%, comunicación personal Gerardo Rumbos) han sido alcanzados por varias empresas (no siempre publicados), sin embargo y a pesar de cifras alentadoras un constante desafío para los laboratorios dedicados a la producción *in vitro* de embriones es mantener la repetibilidad de sus resultados de preñez.

## DESAFÍOS

Los desafíos para la PIVE en Venezuela son tan abundantes como los logros obtenidos y las etapas ya superadas. Estos logros eran desafíos hace una década atrás; sin embargo, destaca de aquella época atrás cuando la FIV comenzaba en el país un viejo anhelo que aún no hemos podido superar, que es la producción continua y con resultados repetibles de medios de cultivo con tecnología y propiedad intelectual venezolana (libre del pago de “royalties” en moneda extranjera). Este punto es importantísimo para que la PIVE pueda difundirse a mayor número de productores a precios más accesibles y de esa manera tenga un mayor impacto a nivel de la producción nacional de carne y leche.

Aspectos básicos de la composición de los medios de cultivo y de la dinámica de los sistemas de cultivo para embriones mamíferos han sido establecidos tras años de investigación en universidades de todo el mundo. Recientemente empresas comerciales también han logrado avances importantes en el área, pero sus progresos no son compartidos tan abiertamente. La gran mayoría de estos aspectos del cultivo embrionario han sido orientados siguiendo y entendiendo la fisiología y metabolismo de gametos y embriones (Revisiones: Hernández-Fonseca y Osorio-Meléndez, 2012, De Ondiz, 2012). Esta misma filosofía de trabajo debe ser seguida por nosotros, aprovechando los conocimientos ya establecidos (Revisados por: Hernández-Fonseca y Osorio-Meléndez, 2012, De Ondiz, 2012) y de manera sistemática ir midiendo y estudiando que adaptaciones nos permiten los mejores resultados en el laboratorio y a campo.

Hay que rescatar la idea de que el gran desafío para la producción *in vitro* de embriones (PIVE) en Venezuela es mantener un nivel de investigación básica y aplicada en estas tecnologías, que permitan desarrollar una base sólida de conocimiento científico que sirvan de base para desarrollar tecnologías o mejoras tecnológicas propias a los procesos ya existentes y así avanzar en la eficiencia del sistema de PIVE.

## PUNTOS CLAVE DE LA PIVE

El objetivo específico a nivel micro y a corto plazo a nivel de una unidad de producción es lograr una tasa de preñez satisfactoria (alrededor de un 40%) a excelente (mayor a un 50%) luego de la transferencia de los embriones producidos *in vitro*. Este objetivo es complementario a objetivos de mediano y largo plazo que se refieren a la multiplicación de los mejores ejemplares del rebaño, la introducción de nuevas razas,

cruzamientos dirigidos al logro de animales F1, acortamiento del intervalo generacional y aspectos del mejoramiento genético acelerado.

Un interesante análisis de Kowalski, que bien podría seguirse en un plan nacional, plantea el uso de tecnologías asociadas que incluyan la MOET (Multiovulación y Transferencia de Embriones), y el uso de semen sexado en la PIVE dentro de núcleos de animales elite, para luego difundir esa acelerada ganancia genética al resto de la población bovina haciendo uso de la inseminación artificial (Kowalski, 2012).

A continuación señalamos los puntos claves a considerar en una operación comercial de PIVE que busque optimizar resultados de preñez:

### **Receptoras**

- Protocolo de sincronización de la ovulación.
- Condición corporal.
- Estatus fisiológico.
- Transporte (en casos necesarios).

### **Donadoras**

- Valor genético.
- Nivel de producción de ovocitos.
- Raza.
- Edad.
- Días post-parto.
- Nivel de producción (Balance energético negativo).
- Condición corporal.
- Frecuencia de sesiones OPU (7 a 30 días entre aspiraciones).
- Transporte.

### **Ambiente**

- Estrés calórico.
- Humedad.
- Acceso a sombra y agua de calidad.

### **Medios de cultivo**

- Producidos o comprados.
- Tiempo de duración.
- Costos derivados de su compra.
- Mantenimiento de condiciones durante el transporte.

### **Laboratorio**

- Equipos
- Calibración.
- Controles independientes de temperatura y dióxido de carbono.
- Rutinas y procesos.
- Ciclos de matadero.
- Calibración de semen nuevo.
- Controles de Contaminación bacterianos o por hongos.

### **Técnicos**

- Experiencia.
- Destreza.
- Identificación con la empresa.

### **Gestión**

- Manejo de donadoras y receptoras.
- Programa de alimentación y nutricional.
- Suplementación mineral.
- Comunicación con todos los eslabones del proceso.
- Informes oportunos.
- Honestidad y responsabilidad.

Entre los puntos clave asociados a la PIVE que hemos destacado solo me referiré a algunos de los aspectos atendiendo a la naturaleza restringida del presente capítulo, pero que en mi experiencia considero son de mucha importancia:

**Receptoras:** Nuestras hembras receptoras de embriones deben ser novillas mestizas *Bos taurus* × *Bos indicus* o razas criollas adaptadas como la raza Carora, en buena condición corporal (no menor a 2,5, preferiblemente 3 en la escala del 1 al 5). Es preferible que las receptoras se encuentren en una franca ganancia de peso y ciclando (presencia de cuerpo lúteo en revisiones ginecológicas previas). Es de suma importancia minimizar las dificultades ofrecidas por la receptora al momento de la transferencia y de esa manera disminuir el tiempo empleado al momento de la transferencia. Es por ello que una buena selección de novillas, que además de los aspectos mencionados incluyan un examen ginecológico que permita verificar la ciclicidad y se descarten animales con cérvix muy estrechas o tortuosas. Es altamente recomendable emplear en esta selección una evaluación ultrasonografía que nos permita en más detalle examinar el aparato genital, incluyendo el diámetro de los cuernos a nivel de la bifurcación. Un diámetro mayor a 2,5 centímetros se ha relacionados a una mayor fertilidad en novillas.

**Donadoras:** En países como Venezuela es recomendable que las donadoras además de ser animales de un alto valor genético y una alta producción lechera, estas deben ser buenas o al menos aceptables productoras de óvulos u oocitos. Según la clasificación utilizada por Pontes y cols., 2011 en vacas Nelore (raza que se caracteriza por una elevada población folicular) una donadora intermedia o aceptable debería poseer un promedio de oocitos por sesión de aspiración OPU superior a los 20 óvulos. En nuestro caso, considero que basado en experiencias propias en el país, para nuestro animal mestizo, Brahman o Gir lechero ese número debería ubicarse al menos en unos 15 óvulos/sesión OPU. Este criterio no es caprichoso, y se fundamenta en dos aspectos fundamentales: el primero es el *uso más eficiente de los medios de cultivo*, la mayoría de los laboratorios utilizan medios adquiridos en el exterior y cancelados en divisas extranjeras. Estos medios se venden a precios que oscilan entre 3,5 y 7 dólares americanos por mililitro (mL) y se gastan alrededor de 2-3 mL para procesar los oocitos resultantes de una donadora hasta el estadio de blastocisto y su empaque en pajuelas. El segundo criterio que soporta este criterio de selección de donadoras es que el *cultivo en grupos numerosos* de hasta 25 oocitos y/o embriones es una condición favorable para estimular el desarrollo de los mismos, esto en contraposición al cultivo de pocos (<9) oocitos/microgota. El cultivo en grandes grupos, muestra amplísimas ventajas en términos de eficiencia de la producción de embriones cuando lo comparamos con el cultivo de ovocitos o embriones en forma individual o pequeños grupos que no superan los 9 ovocitos o embriones. Esta condición debida probablemente a la liberación por parte de estas células o embriones de factores de crecimiento embriotróficos, los cuales favorecen el desarrollo de un mayor número y calidad de embriones en cada microgota o pozo de cultivo. De manera que como resultado de incluir en la selección de las donadoras el criterio de producción de oocitos estaríamos incrementando la producción final de embriones y la posibilidad de obtener un mayor número de preñeces haciendo un uso más eficiente de los medios de cultivo.

Más que un criterio de selección, la habilidad de producir ovocitos es un criterio de eliminación o “un derecho de paso” bajo realidades de países donde los medios de cultivo son cancelados en divisas restringidas y costosas. Esto quiere decir que sin importar el valor genético de las hembras potencialmente donadoras estas serían descartadas como donadoras si no cumplen con el mínimo de 15 ovocitos/sesión OPU.

Una gran ventaja adicional de este criterio de selección por **Bioeficiencia tecnológica** es que esta característica de elevada producción oocitaria tiende a mantenerse constante en el tiempo, cuando se guarda un adecuado reposo entre sesiones de aspiración folicular o OPU (15 a 21 días). Es decir que una alta donadora de óvulos tendera siempre a ser una alta productora (Revisar Pontes *et al.*, 2011, Trabajo de ascenso a Profesor Asociado del Profesor Juan Carlos Gutiérrez, 2013; Hernández-Fonseca *et al.*, 2014, data propia aun no publicada). Adicionalmente un mayor número de oocitos viables están asociados a mayor número y porcentaje de embriones y preñeces, lo cual parece estar asociado a factores intrínsecos del animal donador (Pontes *et al.*, 2011; Hernández-Fonseca *et al.*, 2014, data no publicada).

**Laboratorio:** El laboratorio debe concentrarse en el mantenimiento de condiciones, control y calibración rutinaria de equipos, control de procedimientos y análi-

sis de data generada buscando siempre, hasta donde sea posible, identificar elementos que puedan derivar en resultados más eficientes.

Sobre todo en el aspecto de equipos, que normalmente constituyen el mayor porcentaje de inversión, se debe tener un adecuado entendimiento de su funcionamiento y de su calibración para no permitir variaciones inesperadas de temperatura, humedad o nivel de los gases (oxígeno, O<sub>2</sub>, nitrógeno, N<sub>2</sub>, y dióxido de carbono, CO<sub>2</sub> o sus mezclas).

**Medios de cultivo:** Como sabemos los medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas de la FIV son el elemento crucial en el éxito de la PIVE. Aquellos laboratorios que fabrican sus propios medios deben estar preparados para asumir importantes inversiones iniciales y gastos de mantenimiento de producción de agua ultrapura tipo I (18.2 megaOhms, TOC: <5 ppb, Partículas mayores a 0,22µm/mL: <1 partículas/mL, contenido bacterial: <0.1 CFU/mL y endotoxinas: <0,001 EU/mL). En caso contrario que el laboratorio opte por comprar medios comerciales, estos deben ser transportados y mantenidos con adecuada refrigeración y gaseados constantemente de manera de prolongar su efectividad.

## LA PREGUNTA MÁS DIFÍCIL DE RESPONDER: ¿POR QUÉ NO SE PREÑARON LAS VACAS?

Quizás esta es una de las preguntas más difíciles de responder a las que todos los biotecnólogos nos hemos enfrentado en algún momento, y la respuesta debe incluir el hecho de que la preñez sea por monta natural o con embriones es un fenómeno MULTIFACTORIAL. Como tal, la preñez depende de factores extrínsecos e intrínsecos del propio animal (tanto de la donadora como de la receptora). A todo ello, hay que incluir que en el caso de los embriones *in vitro* se agregan artificios resultado de las imperfecciones de un sistema de cultivo.

En un análisis más específico, tendríamos que destacar que la capacidad de que un ovocito se desarrolle al estadio de embrión (competencia de desarrollo), probablemente signifique poco en términos de su calidad (Revisar Plourde *et al.*, 2012). Aunado a ello, nuestra capacidad para pronosticar o detectar esa calidad embrionaria esta solo limitada a nuestra evaluación morfológica bajo un microscopio estereoscópico que muy poco nos habla de lo que sucede dentro del embrión. Es decir, lo referente a su metabolismo, sus alteraciones mitocondriales, acumulo excesivo de gotas lipídicas, estrés oxidativo, posibles aberraciones en la expresión genética y múltiples otros aspectos que no pueden ser evaluados en los embriones transferidos sin dañar su integridad. En su mayoría estos desperfectos funcionales son secuelas de un cultivo *in vitro* aún distante de las condiciones naturales del útero materno. En el ambiente uterino el suministro de nutrientes y la eliminación de desechos es continuo y no existe la necesidad de extraer al embrión de su ambiente para manipularlo cada dos o tres días, como si sucede bajo condiciones de laboratorio. En otras palabras, nuestra capacidad de certificar la calidad de un embrión transferido a una receptora está limitada por la poca habilidad de medir en forma objetiva y no invasiva parámetros más significativos que el aspecto visual de ese embrión.

Es importante certificar los programas sanitarios implementados, incluso hasta donde sea posible verificar las fechas y calidad de las vacunas empleadas. Muchas veces los productores no están conscientes de que muchas pérdidas de gestaciones se producen en los primeros 8 días y un número significativo ocurre antes del día 16 (Mauer & Chenault, 1983), mucho antes de que se realicen los diagnósticos de gestación tradicionales. Aunque se señalan aberraciones genéticas que pueden explicar la mortalidad embrionaria, existen cantidad de causales que no involucran la calidad del embrión o del proceso de transferencia embrionaria y que se explican por fallas del CL e infecciones bacterianas o virales que no serían imputables en forma directa al proceso de producción *in vitro* de embriones.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones acerca de la PIVE son libres y altamente influenciadas de acuerdo al punto de vista del cual queramos evaluarlas, sin embargo nos permitiremos enumerar algunas lo más objetivamente posible:

1. Los logros de la Fecundación *In Vitro* (FIV) no son fortuitos, sino producto de las investigaciones que por años fueron llevadas a cabo, y nosotros como país solo podremos competir en el área mientras apoyemos nuestras propias investigaciones científicas.
2. La Producción *in vitro* de embriones (PIVE) es una herramienta indispensable para aquellas ganaderías élites que quieren experimentar un rápido crecimiento de su mejor genética. Sobre todo cuando sus productos tienen una alta demanda y precios en el mercado.
3. La PIVE con el uso de semen sexado es la mejor manera de producir hembras F1 que de otra forma serían difíciles de obtener.
4. La PIVE está suficientemente establecida comercialmente en nuestro país y solo promete seguir creciendo, en la medida que el alcance y capacidad de las compañías se amplíe. Esto en gran medida a que ya existe un buen número de profesionales venezolanos formados en el área.
5. Indudablemente el siguiente desafío es la elaboración de medios de cultivo nacionales que puedan ser ampliamente distribuidos lo cual contribuirá a que mayor número de medianos productores pueda hacer uso de esta biotecnología.
6. El establecimiento de un laboratorio de FIV y todos los aspectos relacionados con su funcionamiento, el manejo de las receptoras y donadoras son extremadamente sensibles y determinarán el éxito o fracaso de una operación comercial o científica.
7. Es importante explicar al productor la naturaleza multifactorial de los eventos biológicos involucrados en la biotecnología de la PIVE de manera que tenga unas expectativas cónsonas con los alcances reales de la misma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal Development Following *In Vitro* Fertilization in the Cow. *Biol. Reprod.* (27):147.
- Brackett BG. 1983. A Review of Bovine Fertilization *In Vitro*. *Theriogenology* 19:1.

González-Fernández R, Sánchez-Villasmil NI. 2012. Producción *in vitro* de embriones para los sistemas de producción bovina de doble propósito En: Cuaderno Científico Girar 12. Fisiología y Biotecnología del Embrión. Hugo Hernández Fonseca y Patricia Villamediana Monreal (eds). Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela, Pp. 85-92.

Gutiérrez JC. 2013. Producción de ovocitos obtenidos mediante la técnica de aspiración transvaginal guiada por ultrasonido (ovum pick up) en novillas donadoras de la raza Gyr Lechero (*Bos indicus*). Trabajo de Ascenso a Profesor Asociado. Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad del Zulia.

Hernández-Fonseca HJ, Inciarte-Paez G, Gutiérrez JC, De Ondiz AD, Urribarri YC, Carrillo A. 2014. Data no publicada.

Kowalski-Larralde AA. 2012. Incorporación de biotecnologías embrionarias en programas de producción lechera En: Cuaderno Científico Girar 12. Fisiología y Biotecnología del Embrión. Hugo Hernández Fonseca y Patricia Villamediana Monreal (eds). Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela, Pp. 159-167.

Maurer RR, Chenault JR. 1983. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. *J. Anim. Sci.* (56):1186.

Plourde D, Vigneault C, Lemay A, Breton L, Gagne D, Laflamme I, Blondin P, Robert C. 2012. Contribution of oocyte source and culture conditions to phenotypic and transcriptomic variation in commercially produced blastocysts. *Theriogenology* (78):116.

Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, Seneda MM. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*bos indicus*) donors. *Theriogenology* (75):1640.

Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* (71):690.

Socorro CC. 2006. Análisis de las tasas de preñez en vaquillas sometidas a transferencia de embriones producidos *in vitro*. Tesis de la Especialidad en Reproducción Bovina de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia.