

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS COMERCIALES
SEDE CENTRAL MANAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.



Trabajo de Graduación

Para Optar al Título de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

**EFICACIA DE EMBRIONES BOVINOS *IN VITRO* BAJO LA
TÉCNICA DE ASPIRACIÓN FOLICULAR OPU-FIV EN
NICARAGUA EN EL PERIODO OCTUBRE-NOVIEMBRE 2023**

Sustentantes

Br. Carlos Enrique Salgado Pentzke
Br. Fabiana Arlethy Hernández Paz

Asesor

Lic. Junior Chavarría Rivera M.V.

Managua, Nicaragua
Marzo, 2025

INDICE DE CONTENIDO

SECCION	PÀGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
IV. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	5
V. ANTECEDENTES	6
VI. HIPÓTESIS	7
6.1 Hipótesis de Investigación	7
6.2 Hipótesis Nula	7
6.3 Hipótesis Alternativa	7
VII. MARCO TEÓRICO	8
7.1 Producción de embriones <i>in vitro</i>	8
7.1.1 Técnica de la transferencia de embriones <i>in vitro</i>	8
7.1.2 Producción de embriones <i>in vitro</i>	9
7.2 La técnica Ovum Pick-Up (OPU)	10
7.2.1 Descripción Ovum Pick-Up (OPU)	10
7.2.2 El uso de la técnica Ovum Pick-Up (OPU)	11
7.2.3 Ventajas e inconvenientes de la técnica de OPU-FIV	12
7.2.4 Factores que afectan la técnica de OPU-FIV	13
7.2.5 Pasos para la aspiración folicular (OPU)	13
7.2.6 Sistema de producción <i>in vitro</i> de embriones	14
7.3. Procedimiento de transferencia de embrión	16
7.3.1 Selección de receptoras	16

7.3.2 Transferencia no quirúrgica de embriones	16
VIII. MATERIALES Y METODOS	17
8.1 Ubicación del área de estudio	17
8.2 Diseño metodológico	19
8.3 Variables para evaluar	25
8.4 Recolección y análisis de datos	26
IX. RESULTADOS Y DISCUSION	28
X. CONCLUSIONES	36
XI. RECOMENDACIONES	38
XII. LITERATURA CITADA	39
XIII. ANEXOS	43

DEDICATORIA

A **Dios**, por guiar mis pasos y darme la fortaleza necesaria para alcanzar mis sueños.

A mi madre, **Alma Arlethy Paz Rodríguez**, por su inquebrantable apoyo y confianza en mí para salir adelante. Verte feliz al verme realizada como profesional en veterinaria es el mayor regalo que podía recibir. Este logro es tanto mío como tuyo.

También me dedico a mí misma por el esfuerzo, disciplina y la perseverancia en cumplir mi meta de convertirme en médico veterinario.

Los días difíciles me enseñaron a aprender y madurar, convirtiéndome en una mejor persona. Agradezco cada oportunidad que tuve para crecer profesionalmente en lo que más amo.

Fabiana Hernández

DEDICATORIA

A mis padres **Ligia Desiree Pentzke Chamorro** y **Carlos Enrique Salgado Ríos** por ser mi fuente de inspiración, aliento y apoyo a lo largo de la vida.

A mis abuelos **Carlos Manfredo Pentzke Torres** (Q.E.P.D) y **Ligia Chamorro de Pentzke** (Q.E.P.D)

A mi hermana **Ligia Desiree Roman Pentzke** que siempre me ha brindado su apoyo y amor incondicional a lo largo de mi vida.

A **Bob, Tito y Mila**

Carlos Salgado P.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios**, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este proceso. Su luz me ha acompañado en los momentos más desafiantes y en las alegrías de este camino.

A mi familia **Paz**, principalmente mi madre **Alma Paz**, mi tía **Carmen Paz** y mi tía **Claudia Paz** gracias por su amor incondicional, apoyo constante y por estar siempre a mi lado. Su aliento y confianza en mí han sido fundamentales para alcanzar esta meta.

A la familia **Salgado Pentzke**, su apoyo y motivación han sido un pilar en mi vida. Aprecio cada gesto y palabra que me han brindado a lo largo de esta travesía.

A **mis amigos**, quienes han compartido risas y momentos de reflexión, brindándome su apoyo. Cada uno de ustedes ha dejado una huella en mi corazón.

A nuestro asesor de tesis el **Dr. Junior Chavarría**, por su invaluable apoyo y orientación a lo largo de este proceso. Su dedicación, paciencia y conocimiento han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Agradezco cada una de sus sugerencias y su constante motivación, que me han impulsado a superarme y a alcanzar mis metas. Sin su guía, este trabajo no habría sido posible; Y, por supuesto a **Carlos Salgado**, te agradezco por ser mi compañero incondicional durante toda la carrera, tu amor, paciencia y apoyo han hecho que cada desafío sea más llevadero.

A todos, les dedico este logro con gratitud profunda. Sin ustedes, este sueño no habría sido posible.

Fabiana Hernández P.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** porque ni una hoja se mueve en el viento si no es por su voluntad.

A **mis padres** por ser una fuente de inspiración y apoyo incondicional a lo largo de mi vida. Considero haber ganado la lotería de la vida ya que he tenido la bendición de tenerlos como padres.

A mi novia **Fabiana Hernandez**, no es coincidencia que los mejores años de mi vida y de mayor crecimiento personal los he pasado al lado de ella. Su amor y apoyo incondicional me han catapultado a ser mejor persona cada día.

A **todos los Médicos**

veterinarios que han sido fuente de inspiración y conocimiento. Su vocación de querer enseñar y compartir el saber me ha dado las herramientas necesarias para salir adelante: Juan, Junior, Roberto, Leana, Igor, Wilmar, Camila, Patrick, Emerson, Gustavo, Camilo, Pedro, William.

Carlos Salgado P.

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Planificación Fase de Campo	20
2. Variables a evaluar	25
3. Materiales y Equipos OPU	21
4. Materiales y Equipos Búsqueda de Ovocitos	26
5. Materiales y Equipos transferencia de Embriones	40

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Macro localización Boaco y Camoapa	17
2. Macro localización Tipitapa	18
3. Diagrama anatómico del procedimiento de aspiración folicular	22
4. Procedimiento de aspiración folicular en vaca Guzerat	22
5. Transportadora de Embriones	24
6. Grados y conteo de ovocitos por finca	28
7. Porcentaje de clivaje	30
8. Porcentaje de embriones producidos	32
9. Tasas de concepción por finca	34

INDICE DE ANEXOS

ANEXOS	PÁGINA
a. Clivaje y Porcentaje de embriones producidos Finca 1.	43
b. Clivaje y Porcentaje de embriones producidos Finca 2.	43
c. Clivaje y Porcentaje de embriones producidos Finca 3.	43
d. Clivaje y Porcentaje de embriones producidos Finca 4.	44
e. Embrión nacido en agosto 2024, transferido en octubre 2023.	44
f. Embriones Gyr y Sardo Negro con receptoras criollas.	45

RESUMEN

La producción in vitro de embriones bovinos (PIV), ha revolucionado la ganadería al permitir la multiplicación de animales de alto valor genético lo que contribuye a mejorar la productividad, la calidad genética y la competitividad de las explotaciones ganaderas. La presente investigación tenía como propósito evaluar la eficacia de un protocolo de producción de embriones bovinos, utilizando la técnica Aspiración folicular (OPU) – Fertilización in vitro (FIV), en cuatro fincas de Nicaragua, que permitió analizar los indicadores de: ovocitos viables OPU, Clivajes, Embriones viables y tasa de concepción. Los resultados muestran que el porcentaje de ovocitos viables en las cuatro fincas estuvo por encima de los parámetros aceptables, con valores entre 93% y 100%, lo que se atribuye a condiciones climáticas favorables. En cuanto al porcentaje de clivaje, tres de las cuatro fincas superaron el umbral del 70%, mientras que la Finca 2 obtuvo un 52%, sin una causa clara identificada. Respecto al porcentaje de embriones, tres fincas cumplieron con el parámetro aceptable ($\geq 30\%$), mientras que la Finca 2 presentó un valor bajo, posiblemente relacionado con su menor porcentaje de clivaje. Por otro lado, la tasa de concepción varió entre 23% y 46%, con tres fincas mostrando valores cercanos a los reportados en otros estudios. La Finca 4 presentó la tasa más baja (23%), lo que se atribuye al uso de pollinaza en la suplementación, ya que dietas con alta proteína degradable pueden afectar la fertilidad debido a niveles elevados de nitrógeno ureico sanguíneo.

Palabras Clave: Clivaje, OPU, FIV, biotecnología, concepción, preñez

ABSTRACT

In vitro production of bovine embryos (IVP) has revolutionized livestock farming by enabling the multiplication of high-genetic-value animals, contributing to improved productivity, genetic quality, and competitiveness in cattle operations. This study aimed to evaluate the effectiveness of a bovine embryo production protocol using the Ovum Pick-Up (OPU) – In Vitro Fertilization (IVF) technique in four farms in Nicaragua, analyzing key indicators such as viable OPU oocytes, cleavage rate, viable embryos, and conception rate. The results show that the percentage of viable oocytes in all four farms was above acceptable parameters, ranging from 93% to 100%, which is attributed to favorable climatic conditions. Regarding the cleavage rate, three of the four farms exceeded the 70% threshold, while Farm 2 obtained 52%, with no clear cause identified. In terms of embryo percentage, three farms met the acceptable parameter ($\geq 30\%$), while Farm 2 showed a lower percentage, possibly linked to its lower cleavage rate. On the other hand, the conception rate ranged from 23% to 46%, with three farms showing values close to those reported in other studies. Farm 4 had the lowest conception rate (23%), which was attributed to the use of poultry litter as a dietary supplement. Diets high in degradable protein can affect fertility due to elevated blood urea nitrogen levels, impacting oocyte maturation and embryo survival.

Keywords: Cleavage, OPU, IVF, biotechnology, conception, pregnancy

I. INTRODUCCIÓN

Según Diez, *et al* (2013), la producción de embriones *in vitro* en ganado bovino permite acelerar la mejora genética de la explotación de forma más rápida. Esta técnica permite incrementar la intensidad de selección en los programas de mejora al hacer posible que un reducido número de hembras donantes, pero de alta calidad genética, produzca un elevado número de descendientes por unidad de tiempo. Los embriones se producen a partir de ovocitos que se fecundan (FIV) y cultivan *in vitro* durante un periodo de 7 días, momento en el que se transfieren a hembras receptoras previamente seleccionadas. (p. 35)

Para lograr la producción de embriones de calidad se simula el ambiente del proceso embrionario temprano mediante técnicas como la aspiración folicular guiada por ultrasonido de donantes vivas (Ovum Pick-Up, OPU) o de hembras sacrificadas con la extracción de folículos en mataderos. (Gallegos, *et al*, 2021, p. 173)

La técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU, Ovum Pick-Up), fue desarrollada originalmente para la reproducción asistida en la especie humana y puede ser usada en vacas en distintos estados fisiológicos (cíclicas, no cíclicas, durante el primer tercio de la gestación y en aquellas que no responden a estímulos hormonales), en animales viejos con desordenes reproductivos de origen no genético y en terneras y novillas prepúberes a partir del 6-8 mes de edad. (Sánchez y Ruiz, 2011, p. 797), para la obtención segura de ovocitos.

La aplicación de ambas tecnologías (OPU/PIV) permite la producción de más de cincuenta terneros por vaca donante al año, por lo que se convierten en herramientas adecuadas para un programa de mejoramiento genético. (Ruiz, *sf*, p. 14)

Camargo (2007) como se cita en Sánchez y Ruiz (2011), indica que la OPU es una técnica de la cual no se esperan significativos avances en el futuro; sin embargo, en la PIV (Producción *in vitro*), la mayor comprensión del embrión a través de la aplicación

de tecnologías genéticas tales como los micro-arrays, puede proporcionar información adicional para el desarrollo de un ambiente *in vitro* semejante al desarrollo embrionario *in vivo*. Esta mejora de los medios de cultivo debe dar lugar a mayores tasas de desarrollo embrionario, así como a un incremento de la calidad y bienestar de los animales nacidos posteriormente.

En la última década, la producción mundial de embriones bovinos *in vitro* ha aumentado notablemente. La combinación de tecnologías como producción *in vitro* de embriones con otras técnicas como el uso de semen sexado y la selección genómica ha tenido éxito en diferentes regiones como América del Norte, América del Sur y Europa. Desde 2014, ha habido un incremento en las transferencias de embriones producidos *in vitro* congelados-descongelados. (Gallegos, *et al*, 2021, p. 173)

Nicaragua necesita crecer en el implemento de biotecnologías reproductivas las cuales son cada vez más utilizadas e investigadas en el mundo para el mejoramiento genético y la producción pecuaria. Con la aplicación y conocimiento de las herramientas y procedimientos se permitiría un salto acelerado al objetivo de mejoramiento genético que otros métodos más tradicionales no permitirían.

La presente investigación pretende determinar la eficacia de un ciclo de embriones bovinos producidos *in vitro* a través de la aplicación de un protocolo convencional y específico de OPU-FIV en 4 fincas de Nicaragua en las cuales se evaluarán los indicadores de eficacia como: porcentaje de ovocitos viables, clivajes exitosos, embriones viables producidos y tasas de concepción.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos General

Evaluar la eficacia de la implementación de un protocolo de producción de embriones *in vitro* en bovinos bajo la técnica de Aspiración Folicular OPU-FIV en 4 fincas de Nicaragua durante el periodo octubre-noviembre 2023.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Determinar el porcentaje de ovocitos viables obtenidos a partir de técnica de OPU-FIV en bovinos donadoras de 4 fincas en Nicaragua, en el periodo octubre-noviembre 2023.
- 2.2.2 Evaluar el porcentaje de clivaje de ovocitos obtenidos por la técnica de aspiración folicular OPU-FIV en cada una de las fincas de estudio.
- 2.2.3 Establecer el porcentaje de embriones producidos *IN VITRO* por cada finca sujeto de estudio.
- 2.2.4 Calcular el porcentaje de concepción bajo la técnica OPU-FIV en las cuatro fincas sujetas de estudio.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ganadería bovina en Nicaragua desempeña un papel fundamental en la economía del país, aportando significativamente al sector agropecuario y a la seguridad alimentaria. Sin embargo, la productividad y la calidad genética del hato bovino han sido limitadas por factores como la baja eficiencia reproductiva, la falta de tecnologías avanzadas de reproducción y el escaso acceso a programas de mejoramiento genético modernos (FAO, 2020).

Según el diario nicaragüense “El 19 digital” (2024), en el estudio nacional del Hato ganadero realizado en 2024 se identificaron un total de 349,413 fincas agropecuarias de las cuales 149,812 tenían al menos 1 cabeza de ganado; en este mismo estudio se registraron un total de 5,854,992 cabezas de ganado en Nicaragua, un 0.34% más de lo registrado en 2023.

En este contexto, la producción in vitro de embriones (PIV) se presenta como una alternativa viable para optimizar la reproducción y acelerar el progreso genético en el ganado bovino. No obstante, en Nicaragua, la implementación de esta tecnología ha sido escasa, debido a limitaciones en infraestructura, capacitación y protocolos adaptados a las condiciones locales.

A pesar de que la PIV ha mostrado resultados alentadores en otras regiones de América Latina no se cuenta, hasta ahora, con datos suficientes que avalen su eficacia en el contexto ganadero nicaragüense. Por ello, surge la necesidad de evaluar la eficiencia de un protocolo de producción de embriones in vitro mediante la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonografía (OPU-FIV) en diferentes fincas del país, con el fin de establecer su viabilidad y potencial impacto en la mejora del hato bovino nacional.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La aplicación de biotecnologías reproductivas en la ganadería bovina representa una estrategia clave para el incremento de la productividad y competitividad del sector pecuario en Nicaragua. La PIV es una herramienta que permite aumentar la eficiencia reproductiva y acelerar el mejoramiento genético, factores esenciales para optimizar la producción de carne y leche en el país.

Considerando que según el portal Swissinfo (2021), En 2020, Nicaragua exportó 132,990 millones de kilogramos de carne bovina por un valor de 586,1 millones de dólares, más 166,4 millones de dólares en queso y lácteos. Es justificante reconocer la importancia de la aplicación de tecnologías que aumenten la productividad de un país eminentemente agropecuario.

El presente estudio contribuirá al desarrollo de la ganadería nicaragüense al proporcionar evidencia científica sobre la eficacia de la OPU-FIV en condiciones locales, permitiendo evaluar su aplicabilidad y viabilidad económica. Además, se generará información valiosa que podrá servir de base para futuros programas de mejoramiento genético y reproducción asistida en el país.

Dado que la implementación de la PIV ha demostrado ser exitosa en otras regiones, es crucial determinar su impacto en la producción bovina de Nicaragua. Con este estudio, se espera brindar herramientas para la toma de decisiones en el sector ganadero, facilitando la adopción de tecnologías innovadoras que permitan aumentar la rentabilidad y sostenibilidad del sector.

V. ANTECEDENTES

La producción in vitro de embriones bovinos ha sido ampliamente estudiada y aplicada a nivel mundial, demostrando su eficacia en la mejora de la productividad ganadera. Esta tecnología permite incrementar la intensidad de selección en programas de mejoramiento genético al obtener un mayor número de descendientes de hembras de alta calidad en un periodo reducido. (Gonella et al, 2013)

La combinación de la PIV con otras biotecnologías, como el uso de semen sexado y la selección genómica, ha optimizado la eficiencia reproductiva en regiones como América del Norte y Europa. En América Latina, países como Brasil y Argentina han sido pioneros en la implementación de estas tecnologías, logrando avances significativos en la mejora de la calidad genética del hato bovino. (Rosete et al; 2022)

En Nicaragua, los estudios sobre la aplicación de la PIV son limitados, lo que resalta la importancia de investigaciones como la presente. La aplicación de la OPU-FIV en fincas locales permitirá obtener información clave sobre su viabilidad y eficiencia en el contexto nicaragüense, facilitando la adopción de esta tecnología en el sector ganadero del país.

Se han realizado algunas investigaciones en torno a la aplicación de esta tecnología; como, por ejemplo, la sistematización realizada por Téllez y Ortega (2021), que recolectaron datos de fincas, en los departamentos León y Rivas, que han implementado la transferencia de embriones y reportaron efectividades del 50%. De igual manera Rivera y González (2020), evaluaron la tasa de preñez en transferencia de embriones en lotes experimentales.

Este estudio busca llenar el vacío de información existente y aportar evidencia sobre la aplicabilidad de la PIV en Nicaragua, contribuyendo al desarrollo de estrategias de mejoramiento genético sostenibles y adaptadas a la realidad productiva nacional.

VI. HIPÓTESIS

6.1 Hipótesis de Investigación

El porcentaje de concepción con el uso de embriones bovinos *in vitro* es mayor al 30 por ciento.

6.2 Hipótesis Nula

El porcentaje de concepción con el uso de embriones bovinos *in vitro* es menor al 30 por ciento.

6.3 Hipótesis Alternativa

El porcentaje de concepción con el uso de embriones bovinos *in vitro* es igual al cero.

VII. MARCO TEÓRICO

7.1 Producción de embriones *in vitro*

7.1.1 Técnica de la transferencia de embriones *in vitro*

Según Astiz *et al* (2021), la transferencia de embriones que denominamos *in vivo* (ET) se refiere a la tecnología, ya clásica, desarrollada ya hace más de tres décadas, que consiste en el tratamiento de superovulación de una vaca donante, con el objeto de que ovule no sólo uno o dos ovocitos, como se hace de manera fisiológica, sino hasta 10-15 veces más tarde se extraen los embriones de 7 días. (p. 88)

Cortés *et al* (2023), señalan que la producción *in vitro* de embriones bovinos es una biotecnología consolidada, apoyada en la obtención de ovocitos de donadoras altamente seleccionadas para producir embriones de animales de alto mérito genético. Sus objetivos son servir de herramienta para maximizar el número de crías nacidas parentales genéticamente superiores y facilitar la diseminación de germoplasma reproductivo, la cual aumenta en cada generación de forma cualitativa y cuantitativa. (p. 9)

Según Astiz *et al* (2021), indican que se denominan embriones *in vivo*, ya que están en la vaca donante durante todo el tiempo, hasta su recuperación, momento en el que se transfiere inmediatamente a una receptora (transferencia en fresco), para que continúe su gestación hasta el parto, o bien se congelan y conservan, hasta otro momento de transferencia (transferencia post-descongelación). (pp. 88)

Los ovocitos en la mayoría de los casos provienen de ovarios obtenidos en mataderos y aunque estos representan la fuente más abundante de ovocitos, no garantizan la calidad necesaria para obtener de manera constante altas tasas de blastocitos; tampoco que provengan de hembras de alto valor genético o libres de enfermedades, lo que cobra de gran importancia es la mayor persistencia de los patógenos que se adhieren a la zona pelúcida de los embriones producidos *in vitro*. (Nava *et al*, 2005, p. 611)

Según Seidel y More (2005) como lo cita Vega (2021) menciona que con respecto a la transferencia de embriones, es una técnica que resulta eficaz en la detección de vacas y toros portadores de rasgos mendelianos recesivos indeseables. Así mismo Mebratu, et al, (2020) como se cita en Vega (2021) ejemplifica que en que, para ciertos rasgos como la sindactilia o el enanismo, hay un escaso número de hembras homocigóticas fértiles que podrían usarse para el cruce con toros portadores sospechosos. (p. 20)

Por su parte Vega (2021), aclara la Transferencia de Embriones permite amplificar la producción de embriones de tales hembras, de modo que los toros puedan ser evaluados para determinar el estado de “portadores”. Y, además, también proporciona un método de prueba de las hijas de dichos toros para determinar el estado de “portadores”. (p. 20)

7.1.2 Producción de embriones in vitro

Diez *et al* (2013) menciona que la producción de embriones en ganado bovino permite acelerar la mejora genética de las explotaciones de forma más rápida que la inseminación artificial (IA). En la actualidad existen dos sistemas de producción de embriones: la producción de embriones in vivo, a través de la multiovulación y transferencia de embriones (MOET), y la producción de embriones in vitro. Ambas técnicas permiten incrementar la intensidad de selección de los programas de mejora al hacer posible que un reducido número de hembras donantes, pero de alta calidad genérica, produzcan un elevado número de descendientes por unidad de tiempo. (p. 35)

García y Martínez (2013), citando a Quintana *et al* (2012), explica que la Fertilización in Vitro (FIV) tiene como propósito producir embriones, llevarlos a estadios avanzados para posteriormente ser transferidos a una hembra receptora. Se debe destacar que la eficiencia de esta técnica es inferior a la eficiencia que se obtiene de forma natural. (p. 1)

Alberio (2009), indica que el proceso de producción in vitro de embriones bovinos puede dividirse en tres procesos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, son: maduración de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros y cultivo de embriones, que comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, mucho de los cuales son aún desconocidos. (p. 69)

Gallegos *et al* (2021), menciona que diversos estudios realizados en mamíferos, la calidad de los embriones bovinos producidos in vitro está relacionada directamente con las condiciones de cultivo, durante el desarrollo embrionario de cigoto a blastocisto. En la actualidad, la calidad de los embriones bovinos producidos in vitro aún no es similar a los embriones derivados in vivo. Por lo tanto, es necesario mejorar los sistemas de producción in vitro de embriones, no solo para producir un mayor número de blastocitos, sino, de mejor viabilidad. (p. 174)

Nava y Hernández (2005), mencionan que entre un 50 a 70% de los ovocitos obtenidos son aptos para la fertilización in vitro, alrededor del 90% de estos son fertilizados y entre el 20 al 40% alcanzan el estadio de blastocisto. Por lo tanto, mantener una fuente constante de ovocitos de alta capacidad de desarrollo, alto valor genético y máxima calidad sanitaria es uno de los puntos clave para garantizar un sistema comercial de producción in vitro de embriones. (p. 611)

7.2 La técnica Ovum Pick-Up (OPU)

7.2.1 Descripción Ovum Pick-Up (OPU)

Ruiz (sf), indica que la técnica de punción y aspiración de los folículos del ovario para la obtención de los óvulos mediante la ayuda de la visualización por ecografía es conocida como OPU, siglas del término inglés “Ovum Pick-Up”, que traducido es “recogida de óvulos”. Esta técnica fue desarrollada por la reproducción asistida en la especie humana. (p. 14)

Nava y Trujillo (2005), indican que la OPU (Ovum Pick-up), la aspiración folicular transvaginal es una técnica mediante la cual los ovocitos inmaduros son recolectados de los folículos en los ovaros de una vaca viva por aspiración guiada mediante ultrasonografía a través de la pared vaginal. Dicha técnica adapta los procedimientos de búsqueda ultrasonográfica transvaginal utilizados en humanos y aparece como una solución luego de intentos previos de aspiración de folículos en vacas vivas mediante técnicas como la laparotomía y la laparoscopia. (p. 612)

Díez *et al* (2013), indica que el desarrollo de sistemas de punción transvaginal guiada por ecografía (Ovum Pick-Up -OPU-), permite hoy en día obtener ovocitos de hembras donantes vivas, los cuales, una vez fecundados y cultivados in vitro (OPU-FIV), dan lugar a embriones transferibles a receptoras. La OPU-FIV puede realizarse regularmente y con mayor frecuencia que la producción de embriones por MOET. (p. 36)

Gallegos *et al* (2022), menciona que una de las estrategias para producir embriones in vitro de mejor calidad, es intentar simular el ambiente y los procesos del desarrollo embrionario temprano que ocurre en el trato reproductivo de la hembra bovina. Los embriones bovinos in vitro pueden ser producidos a partir de ovocitos obtenidos mediante aspiración folicular guiada por ultrasonido de donadoras vivas o de hembras sacrificadas mediante la punción de folículos en ovarios obtenidos en el matadero. (p. 174)

7.2.2 El uso de la técnica Ovum Pick-Up (OPU)

Nava y Hernández (2005) menciona que La OPU permite incrementar de forma significativa, el número de embriones transferibles y de preñeces por vaca al año, dada la posibilidad de reutilizar las vacas donantes de ovocitos e intervalos mucho más cortos en comparación con la técnica de superovulación y en comparación con la utilización de ovarios matadero. La técnica permite realizar hasta dos sesiones de aspiración por donante a la semana obteniéndose en promedio unos 4.1 ovocitos/vaca/sesión; además, este número puede llegar a 10.4 ovocitos/vaca/sesión, si las donantes son tratadas por lo que se pueden llegar a obtener entre 50 (sin

estimulación hormonal) y 100 (con estimulación hormonal, FSH + bST) becerros por vaca donante al año. (p. 613)

Ondiz y Ruiz (2011), mencionan que usando esta técnica se consigue producir un mayor número de embriones (hasta 100 embriones al año por vaca) que los obtenidos mediante protocolos estándar de transferencia embrionaria (TE); la aplicación entre (OPU/PIV) permite la producción de más de 50 terneros por vaca donante. (p. 718)

Nava y Hernández (2005), aclara que además, la OPU permite incorporar hembras donantes que se rechazarían en los procedimientos de superovulación por razones de dificultades anatómicas y de otras condiciones. No debe pasarse por alto la posibilidad de incorporar como donantes de ovocitos a hembras jóvenes e inclusive pre-púberes, lo que nos permitiría no solo acortar el intervalo generacional sino también acelerar las pruebas de progenie para la evaluación genética de sementales. (p. 613)

7.2.3 Ventajas e inconvenientes de la técnica de OPU-FIV

Diez *et al* (2013), indica que la técnica OPU-FIV presenta las ventajas de que se puede obtener un mayor número de crías por unidad de tiempo a partir de una misma donante, y que la tecnología no depende del estado reproductivo de la donante. Aunque en la OPU-FIV la superestimulación ovárica puede incrementar el número de embriones transferibles producidos por sesión, el número total de embriones producido por donante puede no aumentar en términos absolutos, debido a los diferentes regímenes de punción. (p. 37)

Diez *et al* (2013), añade que la OPU-FIV permite optimizar el semen, ya que con una misma dosis se puede fecundar ovocitos recogidos de diferentes donantes el mismo día. Además, la OPU-FIV permite que ovocitos procedentes de una sesión de aspiración de una donante puedan fecundarse con semen de toros diferentes, lo que incrementa la variabilidad genética. La OPU-FIV es la herramienta de elección para incrementar las tasas de fecundidad del semen sexado. (p. 37)

El uso de la tecnología OPU-FIV tiene además especial interés en aquellas hembras con problemas de infertilidad, repetidoras, con afectación del tracto reproductivo, o sin respuesta a los tratamientos de superovulación. Es importante destacar que los costes de producción de un embrión por la técnica OPU-FIV son más elevados que la tecnología MOE. (Diez, *et al*, 2013, p. 37)

7.2.4 Factores que afectan la técnica de OPU-FIV

7.2.4.1 Factores técnicos

Ruiz (sf), indica que, sobre la geometría de la aguja de aspiración y la presión de vacío, con lo que se ha conseguido mejorar la calidad de los ovocitos recogidos, recogidos, reduciendo el número de ovocitos denudados, aunque sin que se haya un incremento del número total de ovocitos obtenidos por sesión de OPU. (pp. 14-17)

La mejora técnica más significativa ha sido la sustitución de la aguja original de 50 cm de longitud, por una aguja mucho más corta (7 cm), estéril, descartable y fácilmente reemplazable entre diferentes donantes, reduciendo el riesgo de contaminación. Además, estas agujas tienen un volumen muerto menor, lo que minimiza el tiempo en el que los ovocitos están expuestos a un ambiente desfavorable y permite la obtención de fluido folicular de folículos individuales para propósitos de investigación. (p. 14)

7.2.4.2 Factores biológicos

Ruiz (sf), indica que entre los factores biológicos éstos podemos incluir la vaca donante puede explicar aproximadamente un 20% de la variación observada, la pre-estimulación con hormona con respecto a la calidad de los ovocitos, el intervalo entre sesiones de OPO sobre la cantidad y calidad de ovocitos obtenidos y la experiencia del operador en el desarrollo de la técnica tiene una influencia en el número de la calidad de los ovocitos recolectados. (p. 14)

7.2.5 Pasos para la aspiración folicular (OPU)

La técnica OPU para aspiración folicular *in vivo* se requiere contar con un equipo de ultrasonografía, un transductor sectorial, una bomba de aspiración y un sistema de guía de la aguja. La sonda ultrasonográfica para OPU ha sido construida con la

finalidad de que permita la manipulación de la aguja desde el exterior del animal. (Nava y Hernández, 2005, p. 612)

Peláez (2011), indica que los pasos para la aspiración folicular (OPU) son la tranquilización previa del animal mediante xilacina al 2%; administrar anestesia vía epidural para reducir los esfuerzos expulsivos; limpieza y desinfección de la vulva y área perineal; se introducirá el transductor en la vagina, convenientemente lubricado y protegido; iniciar sesión de punción donde se drenará el sistema aspirando una pequeña cantidad de medio de recogida, aspiración de cada 3-4 folículos y el fluido obtenido de cada animal contenido en un tubo de recogida de 50 ml será inmediatamente filtrado. (Peláez, 2011, p. 15)

7.2.6 Sistema de producción in vitro de embriones

El proceso de producción in vitro de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico según Gallegos *et al* (2021, p.174)son:

- Maduración de ovocitos,
- Fecundación de ovocitos maduros,
- Cultivo de embriones.

Maduración in vitro

Gallegos *et al* (2021), indica que la maduración del núcleo y del citoplasma de los ovocitos es fundamental para la fecundación y el desarrollo embrionario posterior. La maduración nuclear consiste en la reactivación de la meiosis desde la profase I (en la primera división meiótica) a la metafase II (en la segunda división meiótica), hasta el momento de la ovulación. La maduración citoplasmática consiste en la reorganización de orgánulos y la acumulación de ARNm, proteínas, sustratos y nutrientes. La meiosis se detiene en MII hasta el momento de la fecundación, momento en el cual se reanuda y completa la generación del segundo corpúsculo. (p. 176)

Filipiak y Larocca (2010), indican que el proceso de maduración in vivo de los ovocitos, intervienen la hormona folículo estimulante (FSH) en el crecimiento folicular, la

hormona luteinizante (LH), que induce la maduración final y la ovulación del ovocito seleccionado. (p.8)

Para que el proceso de maduración se lleve a cabo debe existir un balance hormonal en el folículo. En un sistema in vitro, este balance natural es imitado agregando las hormonas FSH, LH y estradiol 17 β al medio de maduración (TCM-199). En algunos laboratorios la adición directa de estas hormonas ha sido substituida agregando suero de vacas en celo (SVC) y licor folicular bovino (LFb). Estos componentes biológicos son suficientes para producir maduración (nuclear y citoplasmática), expansión de las células del cumulus y futuro desarrollo del cigoto. (Filipiak y Larocca, 2010, p.8)

Fecundación in vitro (FIV)

Gallegos *et al* (2021), menciona que la FIV es un periodo de incubación de 18 a 24 horas. En esta etapa el semen bovino congelado es descongelado, seleccionado y capacitado antes de la FIV para eliminar elementos no deseados y separar los espermatozoides vivos y móviles. En la práctica, se utilizan métodos como "swim-up" y gradiente discontinuo para la selección de espermatozoides. (p.177)

Gonella, *et al* (2013), indican que una vez completado el proceso de fecundación los cromosomas paternos y maternos se asocian dando inicio al desarrollo embrionario, el cual ya cuenta con un genoma nuevo. (p.74)

Cultivo in vitro (CIV)

Filipiak y Larocca (2010), indican que a las 48 a 72 horas se realiza la primera evaluación de división celular. Posteriormente cada 48 horas hasta los días 9-10 en los cuales los ovocitos fecundados deben encontrarse en el estado de blastocisto y/o blastocisto expandido. (p.13)

Gonella, *et al* (2013), indican que el objetivo de esta etapa es permitir que, los ovocitos fertilizados se desarrollen hasta un estadio embrionario en el que se pueda realizar la transferencia a la receptora. (p.74)

Gallegos *et al* (2021), indica que el CIV de embriones bovinos implica mantener el desarrollo embrionario desde el estadio de cigoto hasta los estadios de blastocistos, durante aproximadamente 7 días. Al inicio del desarrollo embrionario temprano los transcritos de ARN materno y las proteínas producidas y almacenadas durante la ovogénesis son las encargadas de regular el proceso. (p.178)

El cigoto se transforma en un embrión multicelular mediante divisiones mitóticas sucesivas en proceso llamado segmentación. Cada célula generada por segmentación se denomina blastómero y su tamaño disminuye conforme avanza la división celular, sin afectar el tamaño del embrión hasta el estado de blastocisto. Al comienzo de la embriogénesis los blastómeros son totipotentes, lo que significa que puede convertirse en cualquier tipo de célula fetal o adulta. (p.178)

7.3. Procedimiento de transferencia de embrión

7.3.1 Selección de receptoras

Britos, *et al* (2020), indica que las receptoras son aquellas vacas que recibirán el embrión el día de la transferencia y llevarán a cabo la gestación y crianza del ternero. La selección de receptoras a la hora de planificar y ejecutar un trabajo de transferencia de embriones es crucial para el éxito de dicha actividad. Las características importantes de una receptora es contar con un sistema mamario apto de producción de leche, evaluar el canal del parto del animal, pesar un promedio de 400Kg o más, ausencia de preñez, cíclicas y de enfermedades, deben estar desparasitadas. (p. 15)

7.3.2 Transferencia no quirúrgica de embriones

Carmichael, *et al* (1985) recomiendan que las receptoras sean manejadas con cuidado y fijadas en un cepo para garantizar una transferencia suave y prevenir lesiones uterinas durante movimientos bruscos. La anestesia epidural es crucial para lograr resultados uniformes. El dispositivo de transferencia debe ser introducido suavemente en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo. Si se encuentran resistencias o dificultades, es preferible depositar el embrión sin forzar más la inserción. (p. 226)

VIII. MATERIALES Y METODOS

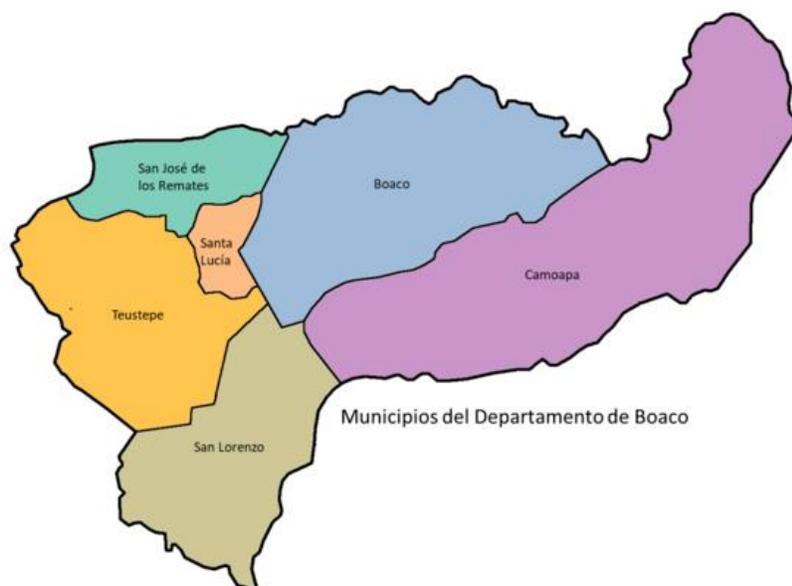
8.1 Ubicación del área de estudio

El trabajo investigativo se realizó en cuatro fincas.

Finca 1 y 2: Fincas vecinas en un área de 180 manzanas ubicada en el municipio de Camoapa Nicaragua. Las coordenadas geográficas de la finca son 12.438969, -85.467852. Esta tiene una elevación aproximada de 500 msnm. Las precipitaciones son de 750 a 1,250 mm al año y la temperatura aproximada es de 26° a 29 grados Celsius. Esta finca está enfocada en la explotación de ganado lechero de las razas Gyr, Guzera, Y Gyrolando. Tienen como finalidad replicar la genética de sus animales puros para aumentar la calidad y cantidad de producción lechera mediante el mejoramiento genético. (Figura 1)

Figura 1.

Macro localización Boaco y Camoapa



Nota: Mapa Departamento de Boaco. Fuente: FamilySearch

Finca 3: Área de 400 manzanas ubicada en el departamento de Boaco. Las coordenadas geográficas son 12.516312, -85.623993. Esta tiene una elevación de 360 msnm la temperatura media oscila entre 26 y 30 grados Celsius y la precipitación anual es de aproximadamente 1200mm. Esta finca busca multiplicar su hato de animales de

raza Gyr ya que esta es reconocida por su producción lechera y su adaptabilidad al trópico. (Figura 2)

Figura 2.

Macro localización Tipitapa



Nota: Mapa Departamento de Tipitapa. Fuente: ZFIT

Finca 4: La cuarta finca se ubica en San Juan de Tipitapa. Tiene un área de 700 manzanas y su ubicación geográfica es 12.172575, -86.037140. Esta tiene una elevación de 54 msnm. La temperatura oscila entre 29 y 34 grados Celsius y tiene una precipitación aproximada de 1100 mm anuales. Esta finca está enfocada en la producción de ganado cárnico. En esta buscan desarrollar animales de razas que presenten buena ganancia de peso y volumen de masa muscular para poder comercializar a la industria cárnica. Estas razas son sardo negro, Brahman al igual que Brangus. También buscan animales adaptados a un clima caliente de la zona lo cual lo aporta el ganado de origen Bos Indicus.

8.2 Diseño metodológico

El presente estudio fue de tipo no experimental con alcance descriptivo y corte transversal que pretendía evaluar la eficacia de protocolo de embriones bovinos in vitro en diferentes fincas de Nicaragua.

Para alcanzar los objetivos planteados el protocolo contemplaba la aplicación de la técnica de aspiración folicular (OPU), para obtener los ovocitos y posteriormente enviarlos al Instituto Nicaragüense de Biotecnología y Reproducción Asistida (INBRA) donde fueron producidos los embriones a través de la fecundación in vitro (FIV), con el semen previamente seleccionado. Cabe señalar que por efectos de control de calidad de los parámetros a evaluar INBRA se encargó de empacar los embriones obtenidos para proceder a la fase de transferencia.

Los embriones fueron transferidos a receptoras previamente evaluadas y que principalmente cumplieran con poseer un sistema reproductor apto y buena condición nutricionales y sanitarias al momento de la inspección. Además, estas receptoras se prepararon con un protocolo hormonal para asegurar una implantación adecuada del embrión; posterior a la implantación se realizó un diagnóstico de gestación por ultrasonografía transrectal a los 30 días después de la transferencia del embrión.

Criterios de inclusión

Vacas donadoras: Vacas con un mínimo de 24 meses de edad y un peso de 300 kilogramos. Vacía o con una gestación menor a 4 meses. Condición corporal de 2 a 3.5.

Vacas receptoras: Vacas con un peso mínimo de 300 kilogramos. Condición corporal de 2.5 a 3.5. Vacas tenían que estar vacías. Aparato reproductor fue evaluado con examen ginecológico por ultrasonido y debían presentar las siguientes características: Ovarios con folículo dominante no menor a 8 milímetros o con cuerpo lúteo. Útero limpio sin presencia de líquido que indique metritis, endometritis o pio metra. Los anillos del cérvix debían de estar bien alineados para no dificultar la transferencia. La

vulva tenía que estar sana con un color rosado y libre de cualquier secreción purulenta o sanguinolenta.

Fase de campo:

La fase de campo consistió en cuatro visitas realizadas por finca y cuyas actividades se encuentran detalladas en la siguiente tabla:

Cuadro 1

Planificación Fase de Campo

Visita 1	Día 0	Selección de receptoras
Visita 2	Día 9	Aspiración folicular y Búsqueda de ovocitos de donadoras
	Día 9 al 16	Periodo de producción de embriones por laboratorio INBRA (Entrega de ovocitos al laboratorio)
Visita 3	Día 17	Transferencia de embriones producidos a las receptoras
Visita 4	Día 30 (Post – transferencia)	Diagnóstico de gestación

Cada una de estas actividades se describen a continuación:

- 1- **Selección de receptoras:** El productor proporciono las vacas que tenia disponible para receptoras. se realizo un examen ginecológico a cada vaca basado en los parámetros descritos en los criterios de inclusión.

Adicionalmente se recomendó que las vacas tuvieran a su disposición una buena cantidad de pasto para cumplir sus necesidades nutricionales además de tener acceso libre al consumo de agua. Se recomendó al productor que las vacas receptoras estuvieran consumiendo suplementos específicamente sales minerales orales en una ración mínima de 80 gramos por vaca al día.

El protocolo de sincronización utilizado en las receptoras de la presente investigación fue el proporcionado por el laboratorio INBRA y que se aplicó de la siguiente forma:

Día 0: Dispositivo intravaginal de progesterona mas 2ml de benzoato de estradiol.

Día 8: Retiro de dispositivo intravaginal mas 1ml de cipionato de estradiol, 2ml de cloprostenol sodico, 2ml de gonodotropina corionica equina (1.5ml vaquillonas).

2- Aspiración folicular: Primeramente se armó una mesa de trabajo a la par de la manga o cepo de contención. Con la vaca dentro del cepo se procedía a limpiar el área de la vulva con abundante agua para evitar contaminación. Luego se procedió a aplicar una anestesia epidural baja con lidocaína al 2 por ciento con el objetivo de que el procedimiento no fuera molesto ni doloroso para el animal y que el operario pudiera manipular el ovario con más facilidad.

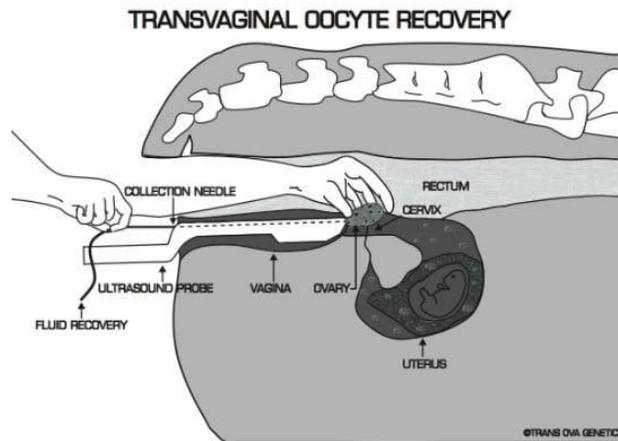
Una vez inducida la anestesia local se procedió a introducir la guía de aspiración en el conducto vaginal de la vaca. Esta guía lleva acoplada en el mandril metálico una aguja de calibre 20g y una línea plástica por donde va pasando el líquido folicular hasta caer al otro extremo de la línea en un tubo recolector de 50ml. Este tubo contiene 5 ml de medio de aspiración comercial previamente preparado por el buscador. El tubo al igual está conectado por una manguera a la bomba de aspiración que creara la presión negativa que permite aspirar el líquido folicular del ovario.

Para el procedimiento se procedio a ubicar el ovario por palpación rectal y se manipulo hasta colocarlo en la punta del transductor acoplado a la guía, esto nos permite visualizarlo por ultrasonido para realizar la punción ovárica.

Luego de aspirar la mayor cantidad de folículos posibles en ambos ovarios se limpió el sistema aspirando medio para asegurar que todo el líquido folicular fue recolectado. La aguja se cambió por cada donadora al igual que el guante protector de la guía de aspiración para asegurar la mayor asepsia posible.

Figura 3.

Diagrama anatómico del procedimiento de aspiración folicular



Una vez terminada la aspiración se marcó el tubo recolectado con la raza y un número que identifique a la vaca y se mandó el tubo a la búsqueda de ovocitos. Este procedimiento se repitió en cada vaca donadora hasta alcanzar el número total necesario.

Figura 4.

Procedimiento de aspiración folicular en vaca Guzerat



Se priorizo recolectar una media de 3 a 4 ovocitos para formar un embrión ya que el porcentaje de clivaje que maneja el laboratorio INBRA es del 70 a 80 por ciento y de conversión embrionaria de un 30 por ciento.

- 3- **Búsqueda de ovocitos:** Para esto primeramente se garantizo un sitio adecuado (Limpio, libre de condiciones ambientales como el viento, polvo o luz solar directa). Se utilizaba un estereomicroscopio para la búsqueda, clasificación y recuento de ovocitos con una platina para mantener los medios en temperatura adecuada y micropipetas para ir capturando los ovocitos una vez estos hayan sido filtrados.

Para la búsqueda clasificamos los ovocitos obtenidos según su grado. Si son grados 1 estos están cubiertos por 4 o más capas de células del cúmulo, zona pelúcida y citoplasma oscuro, los grados 2 cubiertos de 2-5 células del cúmulo y su citoplasma granulado y oscuro, los grado 3 con 1-2 células del cúmulo estos se observarán “desnudos” y su citoplasma irregular y vacuolado, los grados 4 son los ovocitos desnudos con citoplasma heterogéneo. Al finalizar la clasificación realizamos un recuento total de los ovocitos viables y totales encontrados en la muestra lo que corresponderá a la sumatoria de los ovocitos de grado 1, 2 y 3.

Guardamos la información en un registro donde estará la información de cantidad de ovocitos, grado y raza de la vaca que fue aspirada. Una vez finalizamos guardamos en la transportadora los ovocitos para ser enviados al laboratorio de embriología para que estos sean fertilizados.

4 – Producción de embriones Esto estuvo a cargo de INBRA Nicaragua. Este se encargó de todo el proceso de desarrollo embrionario. Una vez finalizado el desarrollo embrionario nos proporcionaron toda la información pertinente del proceso así como los productos a transferir.

4- **Transferencia de embrión:** Los embriones fueron transportados para su transferencia en una transportadora de embriones que los mantiene a una temperatura adecuada de 37 grados Celsius. Todos los productos se encontraban en el octavo día de desarrollo.

Figura 5.

Transportadora de Embriones



En la manga de contención se procedió a confirmar, por ultrasonido y con previa anestesia epidural, en cada receptora la presencia de un cuerpo lúteo como indicador de éxito de la sincronización que confirma que se puede realizar la transferencia. Las vacas que no cumplían con este requisito no fueron transferidas

El embrión fue depositado en el cuerno, correspondiente al cuerpo lúteo. En una hoja se fueron recolectando los números de cada receptora transferida con la numeración del embrión correspondiente. A los 30 días de la transferencia se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonido a cada vaca transferida.

8.3 Variables para evaluar

Tabla 2

Variables a evaluar

Variable	Definición	Indicador	Forma de medición
1. Porcentaje de ovocitos viables	Ovocito es el gameto femenino bovino en estado inmaduro. El grado de cada ovocito permite identificar los que son viables para fertilización in vitro.	Se consideraron viables la sumatoria de los ovocitos: Grado 1: Cubierto por 4 o más capas de células del cúmulo. Citoplasma oscuro finamente granulado y homogéneo. Grado 2: 3 a 4 capas de células del cúmulo. con citoplasma totalmente granulado y oscuro. Grado 3: Con 1 a 2 capas de células del cúmulo. Citoplasma irregular y vacuolado. No se consideraran viables los siguientes: Desnudos o grado 4: Desnudos con citoplasma heterogéneo. Atrésico: Citoplasma expandido ovocito ya maduro.	Observación por estereomicroscopio clasificación de ovocitos.
2. Porcentaje de clivaje	El clivaje es la primera etapa del desarrollo embrionario. En ella, el cigoto fecundado se divide en un conjunto de células menores (blastómeros), que se disponen en una organización espacial concreta (un patrón de clivaje).	Porcentaje de estructuras fecundadas que llegaron a un estadio de 4 a 6 blastómeros en el día 3 del desarrollo embrionario por cada finca.	Hoja oficial de desarrollo embrionario laboratorio INBRA. (Número de estructuras clivadas dividido en número de ovocitos fertilizados)
3. Porcentaje de embriones producidos.	Embrión es un ovulo bovino fertilizado en sus estadios tempranos de desarrollo. En el caso de la fertilización in vitro se transfieren embriones en estadio de blastocisto expandido.	Porcentaje de estructuras que llegaron al estadio de blastocisto expandido del total de ovocitos fecundados por cada finca.	Hoja oficial de desarrollo embrionario laboratorio INBRA. (Numero de embriones producidos dividido en ovocitos fertilizados)
4. Porcentaje de concepción	Numero de vacas gestantes del número total de vacas transferidas de embrión.	Porcentaje de vacas transferidas con gestación confirmada a los 30 días por finca.	Palpación transrectal con ultrasonido.

8.4 Recolección y análisis de datos

Los datos obtenidos de cada variable serán tabulados en una hoja de cálculo de Excel del paquete office® para su posterior determinación y análisis.

5.5. Materiales y equipos

Tabla 3

Materiales y equipos OPU

Materiales	Equipos
Jeringas descartables 5ml Caja de 100 agujas 18 x 1 y medio. Guantes de palpación caja de 100 unidades. Lidocaína al 2 por ciento frasco 50ml Línea de aspiración folicular Rollo de papel toalla Alcohol liquido 1750ml al 70% Caja de agujas de aspiración 20G	Ultrasonido Mindray DP50 Vet. Transductor Mindray micro convexo. Bomba de aspiración folicular WTA Guía de aspiracion folicular para bovino WTA. Mesa portátil despegable.

Tabla 4

Materiales y Equipos Búsqueda de ovocitos.

Materiales	Equipos
Alcohol liquido 1750 ml al 70% Filtro OPU Jeringa descartable 10ml Jeringa descartable 1ml Jeringa descartable 20ml Rollo de papel toalla Bolsas de basura plástica	Estéreo microscopio AmScope Platina térmica WTA Calentador de tubos WTA Pipetas de laboratorio Tanque portátil de co2 Transportadora de ovocitos WTA Mesa portátil plegable

Tubos estéril 50 ml tipo falcón. Placas Petri. Agujas descartables 18 x 1 y medio. Puntas de pipeta de 10ul Puntas de pipeta de 200ul	
---	--

Tabla 5

Materiales y equipos Transferencia de embriones

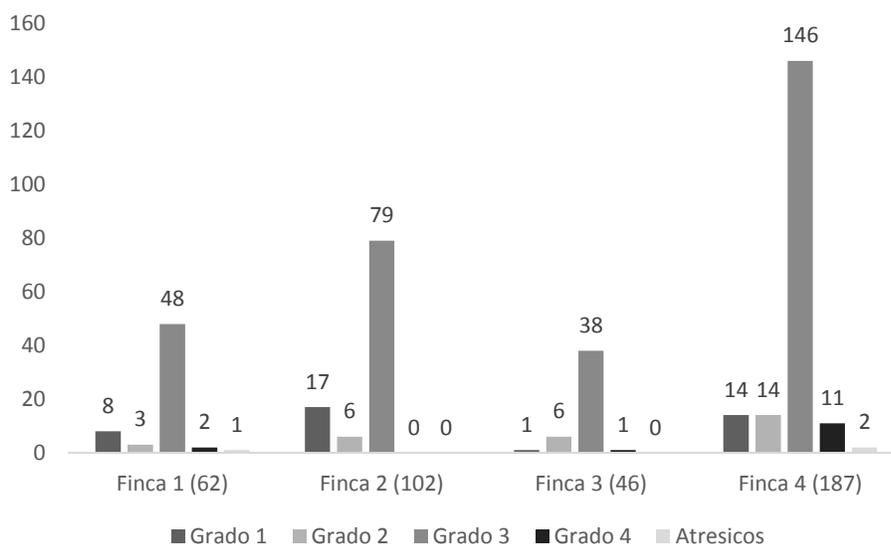
Materiales	Equipos
Rollo de papel toalla Frasco de lidocaína al 2% 50ml Alcohol liquido 1750ml al 70% Caja de agujas 18 x 1 y medio Fundas plásticas estériles para T.E Jeringas descartables 5ml Guantes de palpación caja de 100 unidades.	Aplicador universal para T.E WTA Transportadora de embriones WTA Mesa portátil plegable

IX. RESULTADOS Y DISCUSION

9.1. Porcentaje de ovocitos viables por finca

Figura 6.

Grados y conteo de ovocitos por finca



Nota: Cantidad de ovocitos totales y su clasificación por cada finca.

Como se puede observar en la figura número 6 se obtuvieron 62 ovocitos de 5 donadoras en la Finca 1, de los cuales el 95% (59) eran viables. En la Finca 2, de 3 donadoras, se obtuvieron 102 ovocitos, todos viables. En la Finca 3, de 5 donadoras, se obtuvieron 46 ovocitos, con una viabilidad del 97,8%. Finalmente, en la Finca 4, de 9 donadoras, se obtuvieron 187 ovocitos, de los cuales el 93% eran viables.

La calidad de los ovocitos es un factor esencial que afecta el éxito de los sistemas de producción de embriones in vitro (Fernandez *et al* 2007)

Según Dieleman *et al.* (2002) como se cita en Estrella *et al* (2017) en ovocitos bovinos el porcentaje de ovocitos viables es cerca del 90%; por lo que en el presente estudio se determinó que las cuatro fincas se encontraban por encima de los parámetros aceptables.

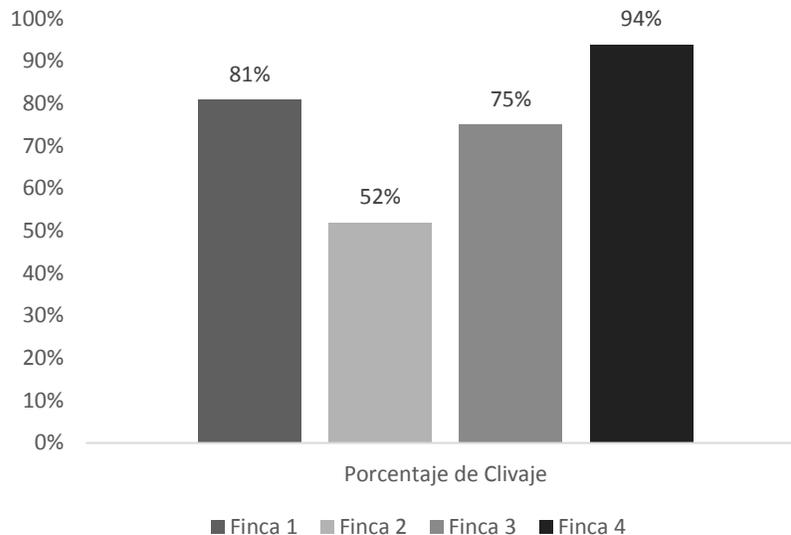
Según Boni (2012), La dinámica folicular varía en relación con varias variables que afectan tanto las características ováricas como la calidad de los ovocitos. Estas variables pueden atribuirse al ambiente, como las variaciones estacionales, el estrés por calor, o al estado fisiológico, como el intervalo posparto, el estado hormonal, la producción de leche, el balance energético, la nutrición, la actividad del ciclo estral o la genética. En consecuencia, una gran variación de la población de folículos/ovocitos puede explicar el tamaño del ovario, el número de folículos y la calidad de los ovocitos.

Como mencionamos anteriormente las cuatro fincas se encontraban con excelentes parámetros por encima de lo normal. A esto atribuyen factores como la época del año (invierno), hay abundante agua y pasturas para el ganado, al igual que un clima fresco. La buena alimentación del ganado acceso a agua y manejo adecuado con suplementos vitamínicos y minerales mejoran la calidad ovocitaria, y la reproducción en general.

9.2. Porcentaje de clivaje por finca

Figura 7.

Porcentaje de clivaje



Nota: Porcentaje ovocitos con clivaje satisfactorio en las cuatro fincas.

Como se puede observar en la figura número 7 cuanto al porcentaje de clivaje en la finca 1 de 57 ovocitos fertilizados 46 lograron un clivaje satisfactorio lo que representa un 81%, en la finca 2 de 87 ovocitos viables fertilizados 45 lograron clivaje satisfactorio lo que representa un 52%. En el caso de la finca 3 de 40 ovocitos viables fertilizados 30 lograron un clivaje satisfactorio lo que representa un 75%. En la finca 4 de un total de 144 ovocitos viables fertilizados 136 lograron un clivaje satisfactorio lo que representa un 94%.

En base al parámetro establecido por el laboratorio INBRA (Aceptable mayor a 70%) solo la finca 2 no cumplió con el clivaje esperado. El resto de las fincas tuvieron resultados similares o incluso mayores. También estos resultados coinciden con porcentajes en otros estudios como el de Currin *et al* (2021), que indica que obtuvieron porcentajes de clivajes del 60% a 70% en un estudio de fertilización *in vitro* realizado en vacas holandesas.

Estos resultados coinciden con el estudio realizado por Rodrigues *et al* (2020), donde ovocitos fertilizados de manera *in vitro* y expuestos a diferentes hormonas y fases del

ciclo estral presentaron porcentajes de clivaje que van desde el 62 hasta el 88 por ciento coincidiendo con el porcentaje de 3 de las 4 fincas en estudio.

En cuanto a la finca con menor porcentaje de clivaje el laboratorio INBRA no reporto ninguna anomalía como una contaminación bacteriana o espermatozoides inmóviles que son las comunes en esos casos, por lo cual no se podría atribuir con exactitud el motivo del resultado.

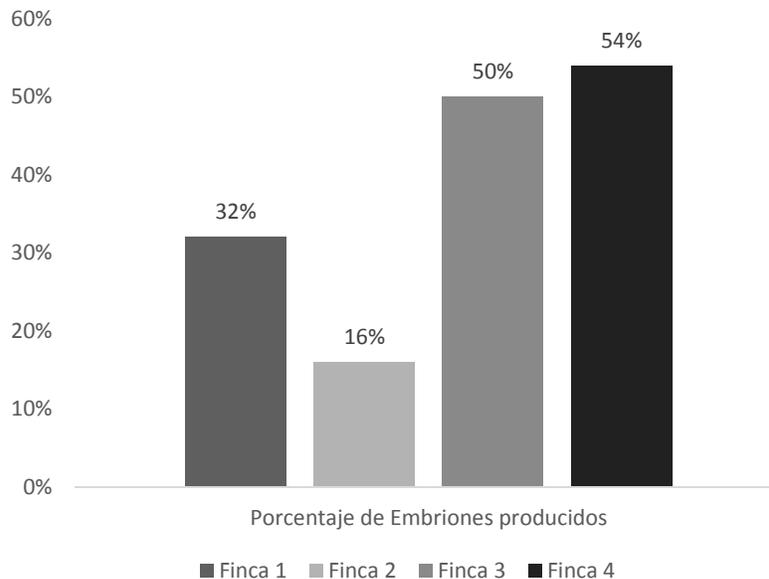
Villamil (2019) Menciona que son posibles causas de clivajes bajos la calidad del semen utilizado. También aclara que los resultados obtenidos en la fertilización *in vitro* son el producto de una compleja interacción de factores que abarcan desde las condiciones de manejo reproductivo de los animales (nutrición, sanidad) hasta la calidad intrínseca de los gametos y la eficiencia de las técnicas de laboratorio (recolección, procesamiento, cultivo). Variables como la composición de los medios de cultivo, las condiciones de incubación y la manipulación de los gametos pueden influir significativamente en el éxito de la técnica. Confirmando así que es muy fácil definir la causa exacta del porcentaje de clivaje descrito en esta finca.

En 3 de las 4 fincas el proceso transcurre con normalidad y se espera que puedan producir la cantidad de embriones esperados. En cuanto a la finca con porcentaje bajo de clivaje puede afectar la cantidad de embriones producidos.

9.3. Porcentaje de embriones producidos

Figura 8.

Porcentaje de embriones producidos



Nota: Porcentaje de embriones producidos en cada finca.

En cuanto al porcentaje de estructuras que llegaron al estadio de blastocisto expandido (BE): en la finca 1 se reporto un 32% (18/57), finca 2 con 16% (14/45), finca 3 con 50% (20/30) y la finca 4 fue del 54% (78 de 136).

En un trabajo investigativo realizado por Karami *et al* (2015) reportaron un porcentaje de producción de embriones del 30.8% hasta un 46.8% de una cantidad de 3,990 ovocitos. Este resultado concuerda con el punto de referencia sugerido por el laboratorio INBRA que establece valores iguales o superiores 30% en producción de embriones in vitro son considerados aceptables.

En base a esto podemos observar que la finca número 2 tuvo un porcentaje bajo de producción embrionaria y las fincas 1, 3 y 4 se encontraban por encima del porcentaje sugerido.

Aguila *et al* (2020) Describen que la eficiencia de las tecnologías de producción in vitro de embriones (PIVE) en especies ganaderas, como bovinos, equinos y porcinos,

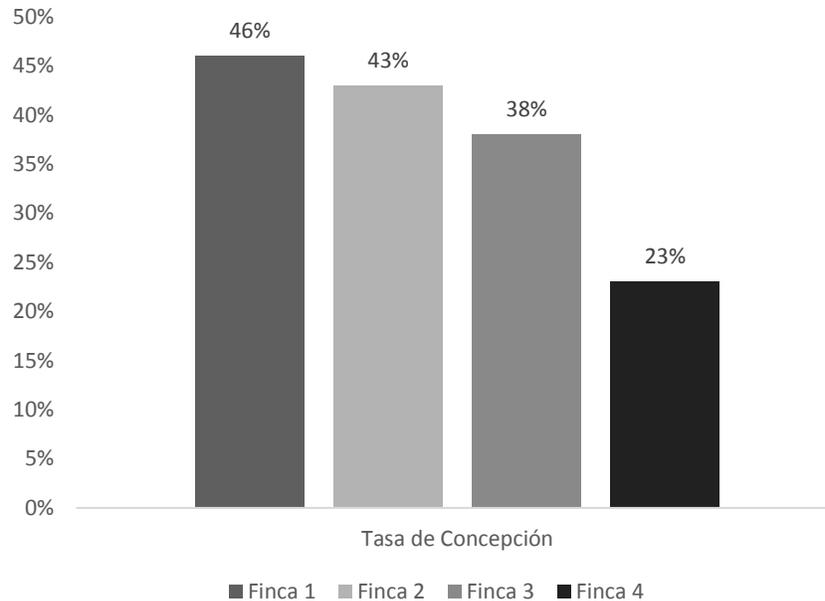
medida como la proporción de ovocitos inmaduros que alcanzan el estadio de blastocisto, rara vez supera el umbral del 30-40%. Esto significa que la proporción de ovocitos que no se desarrollan después de la maduración, fertilización y cultivo in vitro es considerablemente grande. A diferencia de los humanos, donde los óvulos se recolectan principalmente en el estadio MII, en las especies ganaderas, los ovocitos deben madurarse in vitro debido a la dificultad de obtener un número suficiente de ovocitos maduros in vivo."

En cuanto a la finca con un porcentaje bajo de producción de embriones se ve directamente relacionado a un porcentaje bajo de clivaje lo que perjudica directamente la cantidad de embriones producidos.

9.4. Porcentaje concepción por finca

Figura 9

Tasas de concepción por finca



Nota: El porcentaje global de las 4 fincas fue de 37%.

En cuanto la tasa de concepción en la finca 1 de 13 vacas transferidas 6 tenían gestación confirmada a los 30 días correspondiente a un 46%. La tasa de concepción en la finca 2 de 14 vacas transferidas 6 tenían gestación confirmada a los 30 días correspondiente a un 40%. La tasa de concepción de la finca 3 corresponde a 5 vacas con gestación confirmada a los 30 días de 13 transferidas dando como resultado un 38%. La tasa de concepción de la finca 4 es de 39 vacas transferidas 9 tenían gestación confirmada a los 30 días correspondiente a un 23%.

Estos resultados comparten similitud con al estudio realizado por Zavaleta-Martinez *et al* (2024) donde se realizó un estudio de transferencia de embriones en 1087 vacas de razas cebú obteniendo una tasa general de gestación del 37%. Este número es similar a los resultados obtenidos en la presente investigación.

Los resultados son también similares con lo reportado por Valencia *et al* (2023) donde se utilizaron 840 novillas como receptoras de embrión y obtuvieron un porcentaje total

de concepción del 29% número similar a los porcentajes obtenidos en el presente estudio. Con estos estudios comparativos recientes nos damos cuenta que los resultados fueron similares a otros trabajos de transferencia de embriones In vitro realizados en otros países de América Latina.

En cuanto a la finca número 4 que obtuvo un porcentaje bajo el factor que se observó y al cual se le podría atribuir este comportamiento es la suplementación con pollinaza. Ortiz *et al* (2013), hacen énfasis en que la suplementación con pollinaza afecta el pH uterino en vacas ya que dietas ricas en proteína degradable pueden reducir la fertilidad, la maduración de los óvulos y la supervivencia de los embriones por los elevados niveles de nitrógeno ureico sanguíneo. De la misma manera trabajos previos realizados en esta finca reportaron porcentajes de concepción de 0%. A pesar de esto sería necesario realizar otros análisis para atribuir con certeza este bajo porcentaje a los factores antes mencionados.

Adicionalmente Oyuela y Jiménez (2010) aclaran que también influyen en la transferencia de embriones los factores ambientales como frío extremos o calor, tipo de manejo que incluye tanto la parte de nutricional y de suplementación como la sanidad de los animales, la calidad del embrión o también dificultades en la manipulación de la técnica del operario a la hora de la transferencia.

Duica *et al* (2007) Hacen énfasis en otros puntos y establece que dentro de los factores considerados en la aplicación de la técnica biotecnológica de transferencia de embriones es importante controlar los factores que afectan la eficiencia de la hembra receptora, realizando una evaluación de las estructuras ováricas, que garanticen al embrión un ambiente adecuado para su desarrollo post-trasplante.

X. CONCLUSIONES

En cuanto al porcentaje de ovocitos viables por finca, los resultados fueron de 95% (Finca 1), 100% (Finca 2), 97.8% (Finca 3) y 93% (Finca 4), se determinó que las cuatro fincas se encontraban por encima de los parámetros aceptables. Los resultados se pueden atribuir a las condiciones climáticas favorables.

El comportamiento de porcentaje de clivaje en el presente estudio correspondió a: 81% (Finca 1), 52% (Finca 2), 75% (Finca 3) y 94% (Finca 4); reportándose que 3 de las cuatro fincas se encontraban con parámetros aceptables (Mayor al 70%), no pudiéndose atribuir con exactitud el motivo por el cual la finca 2 no alcanzó el parámetro estándar ya que los resultados obtenidos en la fertilización *in vitro* son la interacción de muchos factores.

En cuanto al porcentaje de embriones se determinó un 32% (Finca 1), 16% (Finca 2), 50% (Finca 3) y 54% (Finca 4). Encontrándose que tres de las cuatro fincas se encontraban dentro del parámetro aceptable (Igual o superior a 30%). En cuanto a la finca con un porcentaje bajo podríamos sugerir que este resultado está relacionado a un porcentaje bajo de clivaje lo que probablemente perjudica directamente la cantidad de embriones producidos.

La tasa de concepción reportada en el presente estudio fue de: 46% (Finca 1), 40% (Finca 2), 38% (Finca 3) y 23% (Finca 4); resultados que se acercan, en tres de las cuatro fincas, a los reportados por otros autores: 37% (Zavaleta-Martinez *et al* 2024) y 29% (Valencia *et al* 2023).

En la finca 4 que obtuvo una baja tasa de concepción se atribuye este comportamiento a la suplementación que realizaba la finca con pollinaza; es sabido que esto afecta el pH uterino en vacas ya que dietas ricas en proteína degradable pueden reducir la fertilidad, la maduración de los óvulos y la supervivencia de los embriones por los elevados niveles de nitrógeno ureico sanguíneo.

La hipótesis investigativa dio positiva considerando que la técnica de aspiración folicular es eficaz para lograr el 30% en transferencia de embriones in vitro.

XI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios más detallados para identificar otros factores que puedan influir en la calidad ovocitaria, como la genética de los animales, el uso de hormonas y la técnica de aspiración folicular y que incluyan las influencias medioambientales y nutriciones en el proceso de producción de embriones.
- Realizar ajustes y optimización de los protocolos de producción *in vitro* de embriones para mejorar aún más la eficiencia del sistema.
- Realizar estudios complementarios que incluyan las evaluaciones de la calidad de los gametos para reportar de forma exhaustiva de la calidad de los ovocitos y espermatozoides antes de la fertilización.
- Fomentar los canales de conocimiento para que se promueva el acceso a este tipo de biotecnologías entre profesionales para atribuir a la investigación y al aumento de personal calificado y interesado en estas tecnologías.
- Educar a los productores sobre el uso de biotecnologías y mejoramiento genético de sus hatos ganaderos.

XII. LITERATURA CITADA

Aguila L, Treulen F, Therrien J, Felmer R, Valdivia M, Smith LC. Oocyte Selection for In Vitro Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. (2020), *Animals (Basel)*. Nov 24;10(12):2196. doi: 10.3390/ani10122196. PMID: 33255250; PMCID: PMC7760727.

Arias Tellez A, Henriquez Ortega C, (2022), sistematización de experiencias del proceso de transferencia de embriones en dos fincas ganaderas, de los departamentos de Rivas y León, Nicaragua, febrero – julio 2021. Universidad Nacional Agraria, <https://cenida.una.edu.ni/Trabajoespecial/tenl10a696.pdf>

Boni, R. (2012). Origins and effects of oocyte quality in cattle. *Anim Reprod*, 9 (3), 333-340

Britos Aristides Cano; Acosta Javier; Román Daniel Rodrigo y Domínguez (2020). *Manual de transferencia de embriones*.

Currin, L.; Baldassarre, H.; Bordignon, V. In Vitro Production of Embryos from Prepubertal Holstein Cattle and Mediterranean Water Buffalo: Problems, Progress and Potential, (2021). *Animals* , 11, 2275. <https://doi.org/10.3390/ani11082275>

Diez Monforte, Carmen; Muñoz Marta; Caamaño José; y Gómez Enrique (2013). *Estado actual de los sistemas de producción de embriones en ganado bovino*. Tecnología Agroalimentaria No 12.

Duica, A. Tovyó, N. Grajales, L. (2007). Factores que afectan la eficiencia reproductiva de la hembra receptora en un programa de trasplante de embriones bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 14, 107-124.

El 19 Digital. (2024, 24 de octubre). Crecimiento, potencial y datos claves en el Estudio Nacional del Hato Ganadero 2024 en Nicaragua.

<https://www.el19digital.com/articulos/ver/157321-crecimiento-potencial-y-datos-claves-en-el-estudio-nacional-del-hato-ganadero-2024-en-nicaragua>

Estrella, C. Suconota, A. Ayala L. (2017) Evaluación de la calidad de ovocitos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes. *Revista Científica MASKANA*, Segundo congreso internacional en producción animal especializada en bovinos. Facultad de Ciencia Agropecuarias Universidad de la Cuenca. 8, 101-103

FAO. (2020). Ganadería sostenible en América Latina: Retos y oportunidades. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Fernández, A., Díaz, T., & Muñoz, G. (2007). Producción in vitro de embriones bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, UCV, 48(1), 51-60.

Filipiak; Yael, Larocca; Clara, (2010). *Manual de fertilización in vitro en bovinos*. Facultad de Veterinaria - Universidad de la República Departamento de Reproducción Animal.

Gellegos, Mancheno y Murillo (2021). *Producción de embriones bovinos in vitro: Estado del Arte*. II Congreso Internacional de Producción Pecuaria y Agroindustrial.

Gonella Diaza; Angela María, Atuesta Bustos; Eduardo José, Bernal Ulloa; Sandra Milena, Chacón Jaramillo; Liliana, (2013). Generalidades de la producción de embriones bovinos in vitro. *Revista de investigación Agraria y Ambiental*, Volumen 4.

Karami Shabankareh H, Shahsavari MH, Hajararian H, Moghaddam G. In vitro developmental competence of bovine oocytes: Effect of corpus luteum and follicle size. (2015), *Iran J Reprod Med*. Oct;13(10):615-22. PMID: 26644789; PMCID: PMC4668348.

Nava Trujillo; Héctor, Hernández Fonseca; Hugo, (2005), *Aspiración folicular transvaginal*. Manual de ganadería doble propósito. Universidad de Zulia.

Ortega Rivera I, Jirón González I, (2020), Caracterización reproductiva de vacas lecheras en gestación por trasplante de embriones en finca Santa Isabel, Comarca Matamba, Camoapa-Boaco. En el periodo de febrero a junio 2020. Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/4238/>

Oyuela, L. A., & Jiménez, C. (2010). Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57(III), 191-200.

Rodrigues SAD, Pontelo TP, Kussano NR, Kawamoto TS, Leme LO, Caixeta FMC, Pfeifer LFM, Franco MM, Dode MAN. Effects of Prostaglandins E2 and F2 α on the in vitro maturation of bovine oocytes. (2020), *Domest Anim Endocrinol*. Jul;72:106447. doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106447. Epub 2020 Feb 27. PMID: 32403000.

Rosete Fernández, J. V., Álvarez Gallardo, H., Urbán Duarte, D., Frago Islas, A., Asprón Pelayo, M. A., Ríos Utrera, Á., Pérez Reynoso, S., & De La Torre Sánchez, J. F. (2022). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(3, supl.), Mérida. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>

Ruiz López; Salvador, (sf), Ovum Pick-Up (OPU) en ganado vacuno. Universidad de Murcia; https://www.researchgate.net/publication/260359949_Ovum_Pick_Up_OPU_en_bovinos_Aplicaciones_en_Biotecnologia_de_la_Reproduccion

Sánchez Ondiz y Ruiz López Salvador. *Ovum Pick Up (OPU) y Producción In Vitro de Embriones (PIV) en Ganadería*. Sitio Web: <https://www.researchgate.net/profile/Salvador->

Ruiz/publication/328334439_Aspiracion_folicular_transvaginal_guiada_por_ultra
sonografia_OPU_produccion_in_vitro_de_embriones_PIV_y_semen_sexado_en
_la_reproduccion_bovina/links/5bc6f4f5458515f7d9bdf2d/Aspiracion-folicular-
transvaginal-guiada-por-ultrasonografia-OPU-produccion-in-vitro-de-embriones-
PIV-y-semen-sexado-en-la-reproduccion-bovina.pdf

SWI swissinfo.ch. (2021, 1 de febrero). La ganadería es la «pata» que sostiene la economía de Nicaragua, dice gremio. <https://www.swissinfo.ch/spa/la-ganader%C3%ADa-es-la--pata--que-sostiene-la-econom%C3%ADa-de-nicaragua--dice-gremio/46335844>

Vega García Gascón Fátima (2021). *Biotecnología embrionaria: Transferencia de embriones en ganado vacuno*. Universidad de Santiago de Compostela.

Valencia Ocampo, H. F., Rodríguez Colorado, N., & Mantilla, T. (2023). Factores que afectan la tasa de preñez mediante transferencias de embriones por fertilización in vitro en novillas multirraciales en condiciones de trópico colombiano. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 14(2), 326–338. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i2.6031>

Villamil Alarcon; Erika Natalia, (2019), *Tasa de clivaje con semen congelado de toros Brahman en fertilización in vitro durante abril a septiembre de 2018*; Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.

Zavaleta-Martínez, A. ., Román-Fernández, O., Alpirez-Mendoza, M., Barrientos-Morales, M., Rodríguez-Andrade, A., Cervantes-Acosta, P. ., Hernández-Beltrán, A., Avendaño-Reyes, L., & Dominguez-Mancera, B. (2024). Factores que afectan la tasa de gestación con embriones cebú producidos in vitro en trópico. *Revista MVZ Córdoba*, 29(2), e3453. <https://doi.org/10.21897/rmvz.3453>

XIII. ANEXOS

Anexo a.

Clivaje y Porcentaje de embriones producidos Finca 1.

Hoja Desarrollo embrionario
INSTITUTO NICARAGUENSE DE BIOTECNOLOGIA Y REPRODUCCION ANIMAL

OPU: 2-10-2023 TE: 10-10-23

DONANTE	TORO	RAZA	CLIVAJE	%	PREVIA	%
ROSA	REINAZO	EUR	7/8	88%	3/8	38
SANBA	}	}	15/18	83%	6/18	33
ARQUERA			10/10	100%	5/10	50
ESTRELLA			9/15	60%	4/15	27
CHUCA			5/6	83%	0/6	0
TOTAL			46/57	81%	18/57	32%

Anexo b.

Clivaje y Porcentaje de embriones producidos Finca 2.

OPU: 9-10-23 TE: 12-10-23

DONANTE	TORO	RAZA	CLIVAJE	%	PREVIA	%
ACANEDA	TONSTORY	EUR/No	11/22	50%	3	13
JAULA	}	EUR/No	10/17	59%	5	29
PRINCESA			24/48	50%	6	25
			45/87	52%	14/87	16%

Anexo c.

Clivaje y Porcentaje de embriones producidos Finca 3.

OPU: 5-10-23 TE: 13-10-23

DONANTE	TORO	RAZA	CLIVAJE	%	PREVIA	%
5885	Bengiskhan	EUR	9/10	90	8	40%
5884	}	}	13/14	92	9	64%
2696			4/7	57	3	43%
5886			0/3	0	0	0
5882			4/6	66%	0	0
			30/40	75%	20	50%

Anexo d.

Clivaje y Porcentaje de embriones producidos Finca 4.

Hoja Desarrollo embrionario
INSTITUTO NICARAGUENSE DE BIOTECNOLOGIA Y REPRODUCCION ANIMAL

OPU: 12-10-23 TE: 20-10-23

DONANTE	TORO	RAZA	CLIVAJE	%	PREVIA	%
SIMONA	DANIEL	SN	22/25	88	15	60
CONSA			29/30	97	18	60
2206			13/14	93	8	57
9112			9/9	100	6	66
0468			7/8	88	5	62
1226/2			10/12	83	5	42
105/12			10/10	100	4	40
1048			7/7	100	2	29
1156			29/29	100	15	52
		TOTAL	136/144	94%	78/144	54%

Anexo e.

Embrión nacido en agosto 2024, transferido en octubre 2023.



Anexo f.
Embriones Gyr y Sardo Negro con receptoras criollas.

