

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
Efecto del semen sexado en la producción *in vitro* de embriones
bovinos

Estudiante

Angie Aracelly Castellanos Fuentes

Asesores

John Jairo Hincapié, D.Sc.

Rogel Castillo, M.Sc.

Honduras, septiembre 2024

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

ANA M. MAIER ACOSTA

Secretaría General a.i.

Contenido

Índice de Cuadros	5
Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Materiales y Métodos	13
Localización	13
Obtención de los Complejos <i>Cumulus</i> Oocitos (CCO)	13
Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	14
Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	14
Acondicionamiento del Semen Convencional	15
Acondicionamiento del Semen Sexado	15
Tratamientos	18
Variables Analizadas	18
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	18
Resultados y Discusión	19
Recolección de Oocitos	19
Porcentaje de Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	22
Porcentaje de Clivaje	23
Eficiencia General	24
Porcentaje de Embriones/Ovocitos Viables	24
Porcentaje de Embriones/Ovocitos Madurados	24
Porcentaje de Embriones/Ovocitos Fertilizados	25

Porcentaje de Embriones/Ovocitos Clivaje.....	25
Conclusiones	30
Recomendaciones	31
Referencias.....	32
Anexos.....	35

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Clasificación de los Complejos Cumulus Oocitos (CCO) para procesos de producción in vitro (PIV).....	14
Cuadro 2 Morfología de los embriones bovinos de acuerdo con el estado embrionario	17
Cuadro 3 Clasificación de los embriones de acuerdo con la calidad	17
Cuadro 4 Valores porcentuales de ovocitos fertilizados, en clivaje y embriones.....	23
Cuadro 5 Eficiencia del procedimiento de FIV, en relación con los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje.	26

Índice de Figuras

Figura 1 Ovario de vaca faenada.....	20
Figura 2 Aspiración folicular de oocitos.....	21
Figura 3 Obtención de oocitos.....	21
Figura 4 Oocitos madurados.....	22

Índice de Anexos

Anexo A Materiales utilizados	35
Anexo B Día -1 Lavado de ovarios.....	36
Anexo C Día -1 Aspiración folicular mediante el uso de jeringas.....	37
Anexo D Semen convencional (no sexado).....	38
Anexo E Día 0 proceso de co-cultivo en fertilización	39
Anexo F Día 0 Percoll	40
Anexo G Día 1 semen convencional.....	41
Anexo H Día 3 semen convencional.....	42
Anexo I Día 7 blastos semen convencional.....	43

Resumen

El semen sexado surgió principalmente en ganado lechero para incrementar la cantidad de hembras con alta capacidad reproductiva y buena genética. Tradicionalmente, se ha utilizado semen convencional, pero el semen sexado presenta una alternativa prometedora al permitir un mayor control sobre el sexo de las crías. Sin embargo, existe incertidumbre sobre su eficiencia y viabilidad comparado con el semen convencional. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del semen sexado vs. semen convencional en la producción *in vitro* de embriones bovinos. La investigación se realizó en el laboratorio de reproducción animal de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Se aspiraron 28 ovarios de vacas faenadas en la planta de cárnicos de la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA), dividiéndose en partes iguales para cada tratamiento. De 184 oocitos aspirados, 160 fueron viables y fertilizados. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con dos tratamientos (PIV-convencional y PIV-sexado). Para el análisis de datos se usó la prueba Chi-Cuadrado (χ^2). Los ovarios se transportaron, acondicionaron y suplementaron con antibióticos (estreptomicina 0.5 g/litro + penicilina G 100,000 UI/litro), se utilizaron los medios Minitube® de maduración, capacitación, fertilización y cultivo *in vitro*. El semen utilizado fue de un mismo toro Holstein, sexado para hembra. Se encontró diferencia ($P \leq 0.05$) entre el semen convencional y sexado en el porcentaje de clivaje (81.97% vs. 58.14%), fertilización *in vitro* (87.14% vs. 61.43%) y porcentaje de embriones (78% vs. 56%), respectivamente, siendo el semen convencional más eficiente. En conclusión, bajo las condiciones de este estudio, el semen convencional mostró mayor eficiencia en la producción *in vitro* de embriones bovinos, sin embargo, los porcentajes de embriones obtenidos en ambos tratamientos se encuentran dentro los valores establecidos como muy buenos en la PIV (producción *in vitro*).

Palabras clave: Apoptosis, blastocitos, células del *cumulus*, clivaje

Abstract

Sexed semen emerged mainly in dairy cattle to increase the number of females with high reproductive capacity and good genetic traits. Traditionally, conventional semen has been used, but sexed semen presents a promising alternative by allowing greater control over the sex of the offspring. However, there is uncertainty about its efficiency and viability compared to conventional semen. The objective of this research was to evaluate the effect of sexed semen vs. conventional semen in the *in vitro* production of bovine embryos. The research was carried out in the animal reproduction laboratory of the Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Twenty-eight ovaries were aspirated from cows slaughtered at the meat plant of Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA), dividing them equally for each treatment. Of 184 oocytes aspirated, 160 were viable and fertilized. A completely randomized design (CRD) with two treatments (PIV-conventional and PIV-sexed) was used. Chi-Square (χ^2) test was applied for data analysis. Ovaries were transported, conditioned and supplemented with antibiotics (streptomycin 0.5 g/liter + penicillin G 100,000 IU/liter), Minitube® media were used for maturation, capacitation, fertilization and *in vitro* culture. The semen used was from the same Holstein bull, sexed for female. A difference ($P \leq 0.05$) was found between conventional and sexed semen in the percentage of cleavage (81.97% vs. 58.14%), *in vitro* fertilization (87.14% vs. 61.43%) and percentage of embryos (78% vs. 56%), respectively, with conventional semen being more efficient. In conclusion, under the conditions of this study, conventional semen showed greater efficiency in the *in vitro* production of bovine embryos; however, the percentages of embryos obtained in both treatments are within the values established as very good in IVP (*in vitro* production).

Keywords: Apoptosis, blastocysts, cumulus cells and cleavage

Introducción

La agricultura sostenible se beneficia significativamente de la ganadería, ya que desempeña un papel fundamental al promover la seguridad alimentaria, mejorar la nutrición, combatir la pobreza y fomentar el crecimiento económico. Cuando se implementan las técnicas más avanzadas, el sector puede minimizar su huella ambiental y optimizar el aprovechamiento de los recursos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2024).

Uno de los progresos tecnológicos más destacados en el ámbito de la reproducción de bovinos ha sido la inseminación artificial. Esta técnica ha revolucionado la industria ganadera al permitir una reproducción más eficiente y selectiva. La inseminación artificial no solo mejora la genética de los hatos, sino que también reduce los costos asociados con la cría y acelera la propagación de características deseables, como el rendimiento de leche o la ternera de la carne. Además, contribuye a la conservación de razas ganaderas en riesgo de desaparición y disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades. Es una herramienta crucial para garantizar la sostenibilidad y la capacidad competitiva de la industria ganadera en un entorno mundial en constante transformación (Rosete Fernández et al., 2021).

A través de los siglos en la evolución de la ganadería, uno de los principales objetivos ha sido el control del género de la progenie. En 1992 se adoptó la citometría de flujo, un método que posibilita discernir entre los espermatozoides X y Y en función de su contenido de ADN. La precisión en la determinación del sexo alcanza aproximadamente un 90%, y la tasa de nacimientos de terneros sanos es comparable a la que se obtiene con la inseminación convencional (Oses et al., 2009). El procedimiento de determinar el sexo del semen comprende la separación de los espermatozoides que llevan el cromosoma X de los que transportan el cromosoma Y. Esta técnica se hace posible debido a una diferencia en la carga de ADN entre los espermatozoides con el cromosoma X y los que llevan el cromosoma Y en bovinos, donde los espermatozoides con cromosoma X presentan un 3.8% más de material genético que los que poseen el cromosoma Y (Echeverri Echeverry, 2015).

El propósito del semen sexado es incrementar la cantidad de hembras en la descendencia, permitiendo así el desarrollo de un rebaño con genética comprobada y de calidad superior, donde la inseminación se realiza con semen de alta calidad y se emplean las propias vacas del establecimiento para criar a la progenie (Jimenez Escobar, 2017).

La transferencia de embriones es un procedimiento en el que el papel de la parte materna resulta significativo en términos de las tasas de respuesta genética. La utilización de esta tecnología posibilita acelerar el progreso genético al incorporar la contribución de ambos sexos. Además, los criadores comerciales, tanto en la industria ganadera de carne como de leche, pueden obtener ventajas sustanciales mediante la implementación de programas de transferencia de embriones adecuadamente diseñados, que se adapten a sus condiciones ambientales y objetivos específicos de selección (Seidel, 1981).

El término "Fecundación *in vitro*" (FIV) se refiere a la fertilización que se lleva a cabo en un entorno de laboratorio, donde se controlan los procesos de maduración y la interacción entre los óvulos y los espermatozoides, con el propósito de generar embriones (Jacobson et al., 2022). En el contexto de la FIV en bovinos, este procedimiento abarca varias etapas, que incluyen la recuperación y clasificación de óvulos de especímenes obtenidos en mataderos o de hembras vivas, la maduración de los Complejos Cumulus-Ovocitos (COC), la fertilización y el cultivo del desarrollo de los cigotos. Los embriones resultantes pueden ser destinados a receptoras, congelados o utilizados para investigaciones. Es relevante mencionar que, en laboratorios de investigación, se emplean ovarios de hembras faenadas para obtener los óvulos, los cuales tienen un valor genético prácticamente nulo. Por supuesto, en programas de reproducción, los óvulos provienen de hembras con un alto valor genético (Fillipiak y Larocca, 2010).

Estudios acerca de la aplicación de esta tecnología para la diferenciación de género en el semen indican que se puede lograr una tasa de concepción aproximadamente un 20% menor en comparación con el rendimiento obtenido utilizando semen convencional en novillas que no han sido

previamente inseminadas (Laguado, 2007). Esta disminución en la fertilidad del semen sexado ha sido principalmente atribuida a dos factores clave: 1) el estrés que se produce durante el proceso de sexaje y 2) la baja concentración de espermatozoides por unidad de semen. El procedimiento de separación de espermatozoides a través de la citometría de flujo puede provocar alteraciones a nivel celular que influyen en la integridad de la membrana plasmática, limitando así la viabilidad, la capacidad de conservación, la eficacia en la fecundación y acortando la vida útil de las células (Mora Muñoz, 2018).

Debido a lo expuesto, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del uso de semen sexado en la producción *in vitro* de embriones bovinos, y la calidad de los embriones en función de su estado embrionario. Además, se determinó el porcentaje de clivaje y apoptosis, junto con el porcentaje y la eficiencia de la fertilización *in vitro*.

Materiales y Métodos

Localización

La investigación se desarrolló entre octubre/2023 y julio/2024 en el laboratorio de biotecnología de la reproducción animal de Zamorano, localizado en el Valle del Río Yegüare distante 32 km de Tegucigalpa, Honduras, con unas condiciones climáticas de precipitación promedio anual, altura sobre el nivel del mar y temperatura promedio anual de 1100 mm, 800 msnm y 26 °C, respectivamente.

Los ovarios fueron colectados de vacas faenadas en la planta de cárnicos de la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA), ubicada a 5 km de las instalaciones del laboratorio. Los ovarios fueron transportados al laboratorio en solución salina (0.9% NaCl) a 32-35 °C suplementada con antibióticos (estreptomicina [SIGMA S6501] 0.5 g/litro + penicilina G [SIGMA P7794] 100,000 UI/litro), y en un tiempo no mayor de cuatro horas. Una vez en laboratorio se acondicionaron los ovarios (se retiraron los restos de tejidos peri-ováricos, grasa y sangre).

Obtención de los Complejos *Cumulus* Oocitos (CCO)

Se aspiraron solamente los folículos con un diámetro aproximado de 4 a 10 mm utilizando jeringas de dos piezas y agujas calibre 18 × 1½ pulgadas estériles; el líquido folicular se depositó en un tubo de 50 mL de policarbonato estéril con 5 mL de Medio de Colección de Oocitos (MCO) de Minitube 19990/0050® (10 mL de MCO + 60 mg de Suero Albúmina Bovino EFAF [SIGMA A8806] atemperada a 38 °C cuatro horas antes de realizar la maniobra).

Una vez colectado el fluido folicular, el tubo fue colocado en el baño maría (38 °C) durante 15 minutos a fin de permitir que los oocitos se precipitaran; luego se eliminó el sobrenadante hasta dejar solamente de 5-7 mL de fluido el cual fue vertido en una placa grid para comenzar con la búsqueda bajo la lupa estereoscópica (8X) de los CCO. Se utilizaron los criterios de De Wit et al. (2000) para la clasificación de los CCO utilizando solo los CCO con calidad 1 y 2 (Cuadro 1) y fueron lavados cuatro veces en MCO y una vez en MMO.

Maduración *in vitro* (MIV)

Se prepararon microgotas flotantes de 100 μ l de Medio de Maduración de Oocitos (MMO), utilizando la proporción de 1 CCO/10 μ l de MMO, y cubiertas con aceite mineral (SIGMA M8410) en cajas Petri de 60 \times 10 mm, e incubadas a 38.5 °C, 5% de CO₂, 20% de O₂, 75% de N₂ y saturación de humedad relativa (HR), durante 24 horas.

Para la preparación del MMO suplementado, se utilizaron 9 mL del MMO stock de Minitube MMO 19990/0010® + 1 mL de suero de vaca en celo + 100 μ l de FSH stock (Sioux Biochemical Inc. 715) + 50 μ l de LH stock (Sioux Biochemical Inc. 725) + 135 μ l EGF (5 ng/mL) + 10 μ M /mL de IGF-1; las microgotas se prepararon tres horas antes y se dejaron equilibrando en la incubadora.

Cuadro 1

Clasificación de los Complejos Cumulus Oocitos (CCO) para procesos de producción in vitro (PIV)

Clasificación	Categoría	Células del <i>cumulus</i>	Citoplasma
1	Excelente	Capas múltiples y compactas de células (4 o más)	Homogéneo y transparente
2	Bueno	Capas múltiples de células (entre una y tres)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
3	Regular	Sin células (Denudados)	Irregular con zonas oscuras
4	Malo	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

Nota. Adaptado de Wit et al. (2000)

Fertilización *in vitro* (FIV)

Para el semen convencional se utilizó el medio de acondicionamiento y capacitación Minitube® 19990/0020 stock (10 mL + 60 mg Suero Albúmina Bovino fracción V [SIGMA A8806] + 500 μ l piruvato de sodio [SIGMA P3662 solución stock] + 200 μ l gentamicina [SIGMA G1397]). De este medio suplementado fueron utilizados 8 mL como solución de lavado de espermias y 2 mL para preparar el gradiente de Percoll 45-90%; la preparación de este medio suplementado se realizó tres horas antes de la maniobra y fue llevado a la incubadora a 38.5 °C, 20% de O₂, 5% CO₂, 75% N₂ y humedad relativa a saturación (> 90%).

Para la fertilización propiamente dicha, se utilizó el medio Minitube® 19990/0030 stock (10 mL + 60 mg Suero Albúmina Bovino EFAP [SIGMA A8806] + 100 μ l piruvato de sodio [SIGMA P3662] +

200 µl heparina [SIGMA H3393]); de esta solución suplementada se colocaron 600 µl en cada pozo de la placa nunc de fertilización (no cubrir con aceite) y llevadas a la incubadora a 38.5 °C, 20% de O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (> 90%) mínimo tres horas antes de realizar la maniobra. Cumplido el tiempo de MIV, los CCO fueron lavados por tres ocasiones con medio FIV suplementado y transferidos a las placas nunc de fertilización, se colocaron 40 CCO/pozo.

Acondicionamiento del Semen Convencional

Para preparar el gradiente de Percoll 45-90% que sirvió para el acondicionamiento del semen convencional, se utilizó un tubo de policarbonato de 15 mL colocando en el tubo que contiene el Percoll 45% por sotoposición el gradiente 90% (SIGMA P4937). El semen fue descongelado en agua a 35 °C durante 45 segundos y posteriormente depositado suavemente sobre el gradiente de Percoll 45-90% el cual posteriormente fue centrifugado a 1000 g/10 minutos, posteriormente el pellet se extrajo y se depositó en la solución de lavado y se llevó nuevamente a la centrifuga atemperada (38 °C) a 200 g/10 minutos, el pellet resultante fue aspirado en 200 µl de medio y colocado en 300 µl de medio FIV, de acá se tomó una muestra para evaluar la motilidad individual y la concentración en la cámara de Neubauer, ajustando la concentración a 2×10^6 espermias/mL. Se utilizó como concentración de espermias un promedio de 6000 espermias/CCO. Se utilizó semen congelado empacado tanto en forma convencional como sexado del mismo toro Holstein. El tiempo de FIV fue de 18 horas para ambos tratamientos.

Acondicionamiento del Semen Sexado

Se utilizó semen del mismo toro, pero sexado para hembra. Se utilizó el mismo medio de acondicionamiento y capacitación Minitube® 19990/0020 stock (10 mL + 60 mg Suero Albúmina Bovino fracción V [SIGMA A8806] + 500 µl piruvato de sodio [SIGMA P3662 solución stock] + 200 µl gentamicina [SIGMA G1397]). Este medio suplementado fue repartido en dos tubos cada uno con 3 mL. Se realizaron dos lavados: depositando el semen de una pajueta en un tubo y luego se centrifugaron a 200 g/10 minutos, luego se retiró el pellet y realizó una segunda centrifugación

igualmente a 200 g/10 minutos, luego se retiró el pellet y se depositó en 300 µl de medio FIV suplementado, para calcular la concentración se utilizó la cámara de Neubauer y se inseminó los pozos conservando la misma concentración de espermatozoides/ovocito mencionada anteriormente.

Cultivo *in vitro* (CIV)

Para esta etapa se utilizó el medio de Fluido Sintético de Oviducto (SOF por sus siglas en inglés), colocando 10 mL del medio de cultivo SOF Minitube 19990/0041® stock + 1 mL suero de vaca en celo + 400 µl aminoácidos esenciales (SIGMA B6676) + 100 µl aminoácidos no esenciales (SIGMA M7145) + 60 µl gentamicina (SIGMA G1397); se depositaron 400 µl del medio SOF suplementado/pozo de la placa nunc de CIV y se cubrieron con aceite mineral (SIGMA M8410). La preparación de las placas de CIV se realizó tres horas antes de la maniobra y fueron equilibradas en la incubadora a 38.5 °C, 5% de O₂, 5% CO₂, 90% N₂ y humedad relativa a saturación (> 90%).

Transcurridas las 18 horas de FIV, los presuntos cigotos fueron sometidos al proceso de denudación el cual consistió en remover las células del *cumulus oophorus* a través de la agitación en vortex durante 3 minutos en solución de 900 µl de SOF suplementado + 100 µl de Hialuronidasa, luego fueron lavados tres veces en SOF y transferidos a las placas de cultivo colocando 40 presuntos cigotos/pozo. Transcurridas 72 horas se realizó la suplementación de cada pozo con Suero Fetal Bovino (SFB) en proporción del 10% del volumen total de CIV, además a este mismo tiempo se evaluó el porcentaje de clivaje. Los cultivos fueron evaluados a las 168 horas (7 días) y 192 horas (ocho días) para determinar la producción de blastocistos, los cuales fueron clasificados con base en los criterios de la Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones (IETS 2009) (Cuadro 2 y 3).

Cuadro 2

Morfología de los embriones bovinos de acuerdo con el estado embrionario

Estado embrionario	Morfología
Blastocisto temprano (Bt)	Día 6-7, 100-200 blastómeros. Inicio del transporte de fluido en las células trofo-ectodérmicas (inicia formación del blastocele). El MCI ocupa alrededor del 70-80% del espacio peri-vitelino. Se puede diferenciar el trofoblasto del MCI
Blastocisto (B)	Día 7-8, 100-200 células aproximadamente. Marcada diferenciación entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared –que se adosa a la zona pelúcida- y el MCI (o disco embrionario de color oscuro).
Blastocisto Expandido (Be)	Días 7-8, más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente (1.2 a 1.5 veces) con el consecuente adelgazamiento de la ZP a 1/3 de su espesor original. La presión creciente del blastocisto provoca la ruptura de la ZP a través de la cual comenzará la protrusión hacia el día 8
Blastocisto protruido (Bp)	Días 8-9, 200-800 células. Los embriones abandonan la ZP. Forma esférica con blastocele definido.

Nota. Adaptado de International Embryo Technology Society (2009).

Cuadro 3

Clasificación de los embriones de acuerdo con la calidad

Calidad	Descripción
Excelentes (Clase 1)	Un embrión ideal, esférico, simétrico y con células de tamaño, color y textura uniforme. Zona pelúcida intacta. Debe coincidir con su edad
Buenos (Clase 2)	Presentan pequeñas imperfecciones, como unas pocas blastómeros de forma irregular y posee una pequeña cantidad de detritus celulares. Zona pelúcida intacta
Regulares (Clase 3)	Problemas más definidos que incluyen blastómeros desprendidos e irregulares, vesículas y algunas células degeneradas, detritus celulares. Zona pelúcida intacta o ligero agrietamiento. Un 60% de los blastómeros es normal. Desarrollo retrasado. Color muy oscuro o claro.
Malos (Clase 4)	Embriones que presentan problemas severos, como numerosos blastómeros desprendidos, células degeneradas y/o fragmentadas, células de variables tamaños, numerosas vesículas, pero una aparente masa de embrión viable. Retraso de más de dos días en el desarrollo. Menos del 30% de blastómeros intactos. Ruptura de la ZP. Estos embriones generalmente no son de calidad para transferirlos.
Degenerados (Clase 5)	Degeneración grave. Serios problemas de apoptosis. Zona pelúcida intacta. Cúmulo celular suelto y degenerado, blastómeros pignóticos

Nota. Adaptado de IETS (2009).

Tratamientos

Se utilizaron 140 oocitos distribuidos en dos tratamientos (70 oocitos/tratamiento):

Tratamiento 1: protocolo de producción *in vitro* utilizando semen convencional (PIV convencional)

Tratamiento 2: protocolo de producción *in vitro* utilizando semen sexado para hembra (PIV sexado)

Variables Analizadas

Se analizaron las siguientes variables:

Porcentaje de fertilización *in vitro*

Porcentaje de clivaje (división celular) y apoptosis (muerte celular)

Porcentaje de embriones obtenidos (blastocistos)

Porcentajes de eficiencia general

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con dos tratamientos (PIV-convencional y PIV-sexado) y 70 oocitos/tratamiento. Para el análisis de los datos se aplicó la prueba de distribución de frecuencias Chi-Cuadrado (χ^2) con la ayuda del programa estadístico Statistical Analysis Systems (SAS® 2014 versión 9.4), con un nivel de significancia exigido de $P \leq 0.05$.

Resultados y Discusión

Recolección de Oocitos

La FIV implica la maduración artificial de oocitos (células germinativas no fecundadas) recolectados de vacas faenadas o mediante aspiración folicular guiada por ultrasonido en donadoras vivas. Estos oocitos son fecundados con espermatozoides previamente crio-conservados y capacitados según criterios de calidad. El proceso genera embriones en la etapa de cigotos, los cuales se incuban hasta convertirse en blastocistos. Esta técnica permite obtener un alto número de embriones en una fase específica de su desarrollo (Aragonés et al., 2022). Otros autores, también destacan la importancia de la clasificación de los oocitos, ya que, se debe considerar el *cumulus oophorus*, idealmente con cuatro o más capas compactas de células y un citoplasma homogéneo que presenta un color oscuro en su periferia. Además del número de capas de células alrededor del oocito y la uniformidad del citoplasma (Martínez, 2013).

Los oocitos fueron aspirados mediante la técnica de aspiración folicular. En este estudio, la selección fue basada en una categoría de diámetro aproximadamente de 4 a 10 mm (Figura 1 y 2). Se procesaron 28 ovarios, y aspiraron un total de 184 oocitos, de los cuales solo el 160 (87.5%) fueron viables, y se obtuvo un número de 24 (12.5%) de oocitos degenerados. Estrella et al. (2017), realizaron una selección con base en un diámetro de 4 a 8 mm, obteniendo un 66% de oocitos viables, por lo que, según este estudio, es posible que exista una relación entre el diámetro con el porcentaje de viabilidad. Dado esto, se podría determinar que a un mayor rango de selección de diámetro (4-10 mm), se puede aumentar hasta en un 21.5% más de viabilidad (Cuadro 4).

Los ovarios de hembras castradas y los obtenidos en plantas de faenado animal han sido la fuente de material más utilizada desde los inicios de los trabajos con esta técnica. Debido a la disponibilidad de una gran cantidad de ovarios, esto facilitó avances rápidos en su desarrollo (Ferré y Cattaneo, 2013).

Figura 1*Ovario de vaca faenada*

Se calculó el promedio de ovocitos aspirados, viables y degenerados con relación al número de ovarios procesados (28). El promedio de ovocitos aspirados por ovario indica que, en promedio, se aspiraron aproximadamente 6.57 ovocitos por cada ovario procesado (Figura 2 y 3). Es una medida de la cantidad de ovocitos obtenidos por cada unidad de ovario analizado. El promedio de ovocitos viables por ovario fue de 5.71, lo que representa el promedio de ovocitos que se consideraron viables y adecuados para procedimientos adicionales, como la fertilización *in vitro*. Este valor indica la eficacia del proceso de aspiración y selección de ovocitos viables. De la misma forma, el promedio de ovocitos degenerados por ovario fue de 0.86, lo que refleja la cantidad de ovocitos que no eran viables o que mostraron signos de degeneración durante el proceso de aspiración. Es crucial para evaluar la calidad del manejo de los ovocitos durante la recolección. De los 160 ovocitos viables, el 87.5% de ellos (140 ovocitos) maduraron satisfactoriamente para ser considerados aptos para fertilización, y repartidos en los dos tratamientos (Figura 4).

Figura 2

Aspiración folicular de oocitos

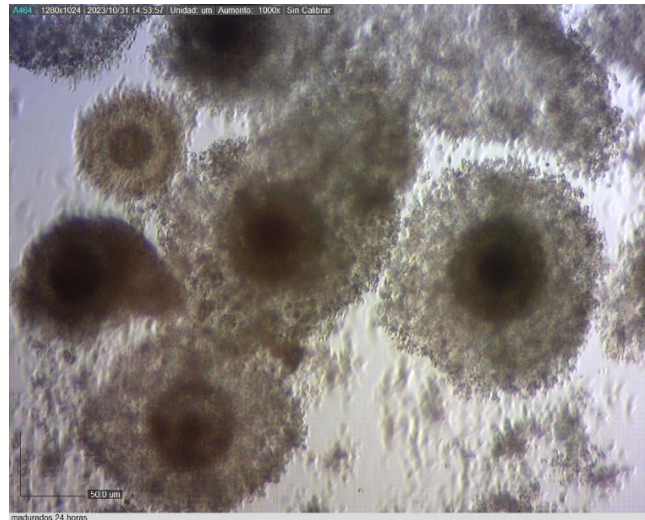
**Figura 3**

Obtención de oocitos



Figura 4

Oocitos madurados



Porcentaje de Fertilización *in vitro* (FIV)

La aplicación de la técnica producción *in vitro* de embriones está creciendo por varias razones clave, incluyendo una mayor producción de embriones en menos tiempo mediante aspiraciones foliculares frecuentes, la posibilidad de obtener embriones de hembras en diversas condiciones fisiológicas, un mayor progreso genético al utilizar toros de alto mérito genético, la modificación de la relación de sexos mediante semen sexado (SS), la garantía de reposición de hembras y la facilitación de la erradicación de enfermedades en el establecimiento (Ferré y Cattaneo, 2013).

Se encontró diferencia ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de ovocitos fertilizados, siendo el tratamiento PIV-convencional el que obtuvo el mayor porcentaje superando al PIV-sexado en 25.71% (Cuadro 4). Bonilla León et al. (2018) obtuvieron resultados de 74.5% para semen convencional y 69.6% para semen sexado, valores similares a los obtenidos en este estudio, ya que, el porcentaje de ovocitos fertilizados de semen convencional fue superior, sin embargo, el tratamiento sexado fue inferior por un 8.17%.

Porcentaje de Clivaje

De la misma forma, se encontró diferencias ($P \leq 0.05$) para los tratamientos semen convencional y semen sexado para la variable clivaje, superando el semen convencional al sexado en 23.83% (Cuadro 4), e igual situación en el porcentaje de apoptosis, el menor valor lo obtuvo el convencional (Cuadro 4). Crespo Calva y Guamán Gutiérrez (2015) obtuvieron 39.80% de apoptosis utilizando semen convencional, valor que se asemeja más a la apoptosis del semen sexado de este estudio, en comparación al bajo porcentaje que se obtuvo con el semen convencional. Por otro lado, estos mismos autores, obtuvieron un clivaje de 60.20% similar al resultado de este estudio con el semen sexado e inferior al porcentaje obtenido con el tratamiento convencional.

Cuadro 4

Valores porcentuales de ovocitos fertilizados, en clivaje y embriones

Tratamiento	Ovocitos Fertilizados (%)	Ovocitos Clivaje (%)	Apoptosis (%)	Embriones (%)
Convencional	87.14	81.97	18.03	78
Sexado	61.43	58.14	41.86	56
CV	20.3794	18.7505	32.8235	17.3866
Probabilidad	0.0005	0.0076	0.0076	0.0485

Porcentaje de Embriones

Hubo diferencia ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 4), siendo el tratamiento con semen convencional el que superó al semen sexado en 22%, sin embargo, ambos valores obtenidos en esta investigación se encuentran dentro de los rangos establecidos por Lonergan et al. (2001) como muy buenos, ya que este autor reporta que lo esperado en el porcentaje de embriones en un laboratorio de PIV debe oscilar entre 25-40%, por lo tanto la decisión en el uso del semen convencional o sexado en la PIV recae directamente sobre el objetivo y la meta de la explotación pecuaria, si requieren exclusivamente de la producción de embriones de un determinado sexo o es indiferente el sexo y se desea producir embriones en cantidad.

En la última década se han alcanzado importantes avances en el establecimiento de un método eficaz para la producción en masa de embriones bovinos, incluidos los sexados. Este progreso no solo ha generado beneficios económicos directos, sino que también ha contribuido al desarrollo de otras biotecnologías como el clonado y la transgénesis animal, mediante mejoras en procesos fundamentales como la maduración de óvulos, la capacitación de espermatozoides, la fecundación y el desarrollo embrionario inicial (Ferré y Cattaneo, 2013).

Eficiencia General

Porcentaje de Embriones/Ovocitos Viables

Se encontró una diferencia ($P \leq 0.05$), en el porcentaje de embriones por ovocitos viables, siendo el tratamiento convencional el más eficiente en la producción de embriones por cada ovocito viable (Cuadro 5). Oses et al. (2009) mencionan que los porcentajes más bajos obtenidos con semen sexado son producto de altas contaminaciones, sin embargo, concluyeron que la tasa aceptable de blastocitos adquiridos en uno de sus grupos expresa que el semen sexado puede ser utilizado para la producción *in vitro* de embriones, sin embargo, sugiere que se realicen mejoras para minimizar el daño durante el proceso, y que su aplicación comercial sea exitosa. Considerando que los resultados son variables, Xu et al. (2009), y otros investigadores han realizado estudios orientados a mejorar las tasas de división y la calidad embrionaria. Los factores tomados en consideración son maduración de los ovocitos, proceso de sexado, concentración espermática, cultivo de los embriones y criopreservación de estos.

Porcentaje de Embriones/Ovocitos Madurados

La maduración ovocitaria, también conocida como "maduración meiótica", es el proceso durante el cual el ovocito reanuda la meiosis, que había sido interrumpida en el estado de dictioteno de la profase I, hasta alcanzar el estadio de metafase II. Durante este proceso, los ovocitos adquieren la capacidad de ser fertilizados normalmente y de desarrollarse adecuadamente hasta el estadio embrionario (Ferré y Cattaneo, 2013).

Se encontró una diferencia ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de embriones por ovocitos madurados entre el tratamiento convencional y sexado (Cuadro 5). El semen sexado mostró un rendimiento inferior en un 35.71% en comparación con el tratamiento convencional. En investigaciones previas de producción *in vitro* de embriones bovinos utilizando semen convencional de diferentes razas de toros, se reportaron porcentajes de maduración de ovocitos de 66.17%, 50.94%, y 59.50% (Báez Contreras et al., 2010). Estos hallazgos subrayan la marcada disparidad en la eficacia de la maduración ovocitaria entre los métodos de inseminación, destacando la importancia de investigaciones adicionales para comprender las causas subyacentes de estas diferencias.

Porcentaje de Embriones/Ovocitos Fertilizados

En el caso del semen sexado (SS), generalmente con una pajuela se pueden fecundar entre 100 y 120 ovocitos. La tasa de fertilización, medida como la tasa de clivaje a las 48 horas después de la inseminación, típicamente varía entre el 70% y el 85% de los ovocitos expuestos a los espermatozoides (Ferré y Cattaneo, 2013).

Se encontró una diferencia ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de ovocitos fertilizados entre el semen convencional y el tratamiento sexado (Cuadro 5). El semen convencional mostró una eficiencia considerablemente mayor, superando casi el doble del porcentaje obtenido con el sexaje del semen (31.37%). Estos hallazgos subrayan la superioridad del semen convencional en términos de fertilización *in vitro*.

Díez Monfarte et al. (2022) mencionan que la técnica de OPU-FIV es mucho más eficiente para mejorar las tasas de fertilidad del semen sexado, ya que permite reducir la cantidad de espermatozoides necesarios para la fecundación de los ovocitos, por lo que podría ser utilizada para obtener mejores resultados que sean superiores o iguales a los del semen convencional.

Porcentaje de Embriones/Ovocitos Clivaje

Nuevamente, se observa una diferencia ($P \leq 0.05$) en el porcentaje de embriones por ovocitos en la etapa de clivaje entre tratamientos (Cuadro 5), sin embargo, los valores obtenidos con el semen

sexado se encuentran dentro de lo establecido y considerado por la literatura internacional como muy bueno (Lonergan et al., 2001). Los resultados de Lucyna et al. (2006) coinciden con los obtenidos en este estudio, con diferencias significativas en el clivaje. Esto indica que el tratamiento convencional es más eficiente en producción de embriones, sin embargo, el semen sexado tiene una tasa de aceptación muy buena. Machado et al. (2009) obtuvieron un porcentaje de clivaje de 65 - 85% y de desarrollo embrionario de 17 - 47%; en este estudio, si bien se obtuvo un menor porcentaje de clivaje, el desarrollo embrionario fue mayor en un 9% más que el rango máximo obtenido en su investigación. De la misma forma, Promthep et al. (2015) tuvieron un 88% de clivaje y un 34% de desarrollo, superando el porcentaje de clivaje, pero con un 22% menos en cuanto al desarrollo embrionario.

Asimismo, en el estudio de Oses et al. (2009), la tasa porcentual de división embrionaria obtenida con semen sexado (80.6 ± 3.2) fue superior que con semen convencional (68.2 ± 4.5 ; $P < 0.01$); sin embargo, al analizar el porcentaje de blastocistos, los resultados fueron opuestos (10.6 ± 4.5 vs. 22.2 ± 3.3 , respectivamente; $P < 0.01$). Aunque el semen sexado puede iniciar la división celular de manera eficiente, las manipulaciones y el estrés involucrado en el proceso de sexado pueden comprometer la calidad de los espermatozoides, afectando negativamente las etapas posteriores del desarrollo embrionario, como la formación de blastocistos.

Cuadro 5

Eficiencia del procedimiento de FIV, en relación con los embriones producidos con los ovocitos viables, madurados, fertilizados y clivaje.

Tratamiento	Embriones/ ovocitos viables (%)	Embriones/ ovocitos madurados (%)	Embriones/ ovocitos fertilizados (%)	Embriones/ ovocitos en clivaje (%)
Convencional	48.75	55.71	63.93	78.00
Sexado	17.50	20.00	32.56	56.00
CV	18.3461	18.3741	12.1813	17.3866
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	0.0016	0.0485

Araujo et al. (2014) señalan que se observó una alta contaminación en los medios de cultivo de embriones fertilizados con semen sexado. Las tasas de desarrollo de blastocistos fueron

notablemente menores para los ovocitos fertilizados con semen sexado en comparación con el semen convencional. Razón por la que se debe considerar tener el mayor cuidado posible durante el proceso cualquier foco de contaminación para que haya la menor cantidad posible de embriones no viables.

Por otro lado, Filipiak et al. (2017) determinaron que la capacitación de espermatozoides en la fertilización *in vitro* (FIV) es crucial para lograr altos índices de producción de embriones. Se han creado diversos medios de cultivo, entre los cuales la centrifugación en gradientes de densidad de Percoll destaca por su capacidad de distinguir entre espermatozoides vivos y muertos. Por otro lado, el medio BO (Brackett y Oliphant, 1975) capacita a los espermatozoides sin efectuar esta selección. Por lo que, en este estudio se concluye que el uso de Percoll es efectivo para seleccionar espermatozoides viables, lo que resulta en una mayor producción de embriones.

La FIV puede ser una herramienta efectiva para producir embriones del sexo deseado en la producción bovina, lo que incrementa los reemplazos (Filipiak et al., 2017). La Comisión Sectorial de Investigación Científica (2015) afirma que el semen sexado tiene el potencial de mejorar los programas reproductivos, aunque con un costo elevado. Una limitación del semen sexado es su menor fertilidad en la inseminación artificial. Sin embargo, mencionan que la FIV podría aumentar las posibilidades de uso del semen sexado como modelo experimental y permitir la obtención de más embriones del sexo deseado. Además, junto con la técnica de punción folicular *in vivo* (OPU), aplicada a vacas selectas a nivel de producción, podría tener un impacto significativo.

Tradicionalmente, la Transferencia Embrionaria (TE) se centraba en técnicas de superovulación y producción de embriones establecidas desde hace casi tres décadas. Sin embargo, en la última década, la tecnología *in vitro* ha ganado terreno significativo en muchos países. La Fecundación *in vitro* (FIV) se prefiere en casos como donantes prepúberes, uso de semen sexado en vacas mayores, producción intensiva de embriones, y cuando hay disponibilidad limitada de semen por costo o disponibilidad. En cambio, la TE *in vivo* es ideal para novillas o vacas jóvenes cíclicas que

siempre están vacías, con objetivos moderados de producción y cuando se desea congelar embriones para banco o comercialización, sin restricciones normativas para el uso de hormonas (Calier, 2021).

Los resultados de este estudio indican de manera consistente que el tratamiento convencional de FIV es más eficiente en términos de producción de embriones en todas las etapas evaluadas (ovocitos viables, madurados, fertilizados y en clivaje) en comparación con el tratamiento sexado. El costo de implementar el semen sexado para fertilización *in vitro* es alta, además de tener una tasa de concepción más baja de aproximadamente 10% a un 20% menor en comparación con la del semen convencional (Benedictis Delphino, 2021), sin embargo, el tratamiento sexado es una gran alternativa, ya que, tiene un gran potencial de mejora con los avances tecnológicos para eficientizar e igualar la fertilidad del semen convencional.

Romo García y Álvarez Gallardo (2019) mencionan que con la combinación de producción *in vitro* de embriones, el uso del semen sexado y transferencia de embriones de sexo femenino, se generan gestaciones con embriones del mismo sexo, reduciendo la probabilidad de Freemartinismo (la mayoría de las hembras que experimentan una gestación gemelar junto a un feto macho resultan ser estériles), y aumentando la proporción de gestaciones con gemelos del mismo sexo y bajo peso al nacer. Esto abre la posibilidad de lograr resultados que anteriormente no se podían alcanzar con semen convencional.

Además, se destaca que los porcentajes de concepción logrados con el semen sexado de última generación, con una concentración de cuatro millones de espermatozoides por pajilla, se acercan a los obtenidos con el semen convencional (Thomas et al., 2017).

Algunas de las principales recomendaciones para uso del semen convencional según compañía Sexing Technology son que el semen sexado debe utilizarse únicamente en vaquillas vírgenes o vacas con un historial excelente de concepción mediante IA, y la inseminación debe realizarse de 14 a 16 horas después de los primeros signos de estro en animales que muestren señales claras de un buen celo. Es aconsejable evitar el uso de semen sexado en vacas que hayan recibido más

de dos o tres servicios y en animales que se encuentren en situaciones estresantes que puedan afectar los porcentajes de concepción. Este tipo de semen debe aplicarse en programas de IA bien establecidos y preferentemente por técnicos con experiencia (Romo García, 2016).

Conclusiones

Se determinó que el mayor porcentaje de fertilización *in vitro* (FIV) se obtuvo con el semen convencional en comparación con el semen sexado.

Los mayores porcentajes de apoptosis se encontraron con el semen sexado, mientras que el tratamiento con semen convencional logró un mayor porcentaje de clivaje.

La mejor eficiencia del proceso de fertilización *in vitro* (FIV) de embriones bovinos se obtuvo con el semen convencional.

Recomendaciones

Utilizar semen convencional como primera opción cuando la determinación del sexo no es crítica.

Evaluar el efecto del semen sexado y convencional con diferentes razas de toros.

Evaluar el porcentaje de preñez del semen convencional y el semen sexado, y compararlos entre sí.

Investigar si hay una relación estrechamente proporcional entre el tamaño de los oocitos y el porcentaje de viabilidad.

Referencias

- Aragonés, P., Bermúdez Fernández, I., Ortiz Cardenas, I., Sánchez Alpízar, J. y Madrigal Valverde, M. (2022). Aspectos relacionados con la fertilización in vitro (FIV) en bovinos, una revisión bibliográfica. *Revista AgroInnovación En El Trópico Húmedo*, 3(22). <https://revistas.tec.ac.cr/index.php/agroinn/index>
- Araujo, M. S., Volpato R. y Lopes M. D. (2014). Produção de embriões bovinos in vitro com sêmen sexado, Brasil. <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/17370/18214>
- Báez Contreras, F. J., Chávez Corona, A. C., Hernández Fonseca, H. J. y Villamediana Monreal, P. C. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista Científica*, XX(3), 10. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95916116007.pdf>
- Benedictis Delphino, M. G. (2021). ¿Qué es el semen sexado? Sus pros y contras en la inseminación artificial en animales de granja. <https://www.universodelasaludanimal.com/ganaderia/que-es-el-semen-sexado-sus-pros-y-contras/>
- Bonilla León, L., Mejía Gallego, A., Gómez Domínguez, R., Torres Londoño, M. y Uribe García, F. (2018). Viabilidad y tasa de preñez de embriones producidos in vitro a partir de semen sexado comparado con semen convencional en *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(4), 1377–1385. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.14297>
- Brackett, B. G. y Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, 12(2), 260–274. <https://doi.org/10.1095/biolreprod12.2.260>
- Calier. (2021). ¿Es mejor usar Transferencia Embrionaria o Fecundación In Vitro en animales? <https://www.calier.com/es/blog/es-mejor-usar-transferencia-embrionaria-o-fecundacion-vitro-en-animales>
- Comisión Sectorial de Investigación Científica. (2015). Eficiencia del semen sexado en la fertilización in vitro respecto al no sexado con dos técnicas de capacitación espermática en bovinos. Universidad de la República de Uruguay. <https://www.csic.edu.uy/content/eficiencia-del-semen-sexado-en-la-fertilizaci%C3%B3n-vitro-respecto-al-no-sexado-con-dos-t%C3%A9cnicas>
- Crespo Calva, J. L. y Guamán Gutiérrez, E. G. (2015). Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano utilizando el protocolo de Genes Diffusion [Proyecto Especial de Graduación]. Zamorano. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/7f33e203-b4f0-461f-85d8-5fbf9872e24f/content>
- Díez Monfarte, C., Muñoz Llamosas, M., Caamaño Gualdoni, J. N. y Gómez Piñeiro, E. (2022). Estado actual de los sistemas de producción de embriones en ganado bovino. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=5572>
- Echeverri Echeverry, J. D. (2015). Uso de semen sexado en bovinos [Tesis de pregrado]. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia. <https://core.ac.uk/download/pdf/71399225.pdf>

- Estrella, C. A., Suconata, A. G. y Ayala, L. E. (2017). Evaluación de la calidad de ovocitos bovinos obtenidos de folículos con tres tamaños diferentes [Tesis de pregrado]. Universidad de Cuenca, Ecuador. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8383544.pdf>
- Ferré, L. y Cattaneo, L. (2013). Biotecnologías reproductivas: producción in vitro de embriones y semen sexado (¿La pareja perfecta?). https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embionario/38-biotecnologias.pdf
- Filipiak, Y., Larocca, C [C.] y Martínez, M. (2017). Comportamiento del Semen Bovino Sexado Congelado-Descongelado en Fertilización in vitro (FIV) Capacitado Mediante BO en dos Concentraciones versus Percoll. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1337–1341. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401337>
- Filipiak, Y. y Larocca, C [Clara]. (2010). Manual de fertilización in vitro en bovinos. Universidad de la República. https://www.researchgate.net/profile/Yael-Filipiak/publication/230801504_Manual_de_Fertilizacion_In_Vitro_en_Bovinos/links/0fcfd5048d3d8a23d1000000/Manual-de-Fertilizacion-In-Vitro-en-Bovinos.pdf
- International Embryo Technology Society. (2009). *Reproduction, Fertility and Development*. 1. <https://www.iets.org/Meetings/Previous-Meetings/2009-IETS-Annual-Meeting>
- Jacobson, J., Zieve, D. y Conaway, B. (2022). Fecundación in vitro (FIV). <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007279.htm>
- Jimenez Escobar, C. (2017). Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción bovina. https://docplayer.es/23577707-Tecnicas-de-congelacion-y-sexado-del-semen-bovino-y-su-importancia-en-reproduccion-bovina.html#google_vignette
- Laguado, J. (2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2), 1077–1095. <https://www.redalyc.org/pdf/693/69312215.pdf>
- Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F. y Boland, M. P. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development*, 41(5), 427–437. <https://doi.org/10.1051/rnd:2001142>
- Lucyna, K.-K., Bożenna, r., michał, b., Jolanta, O. y and Joanna Jurkiewicz. (2006). In vitro production of bovine embryos using flow-cytometrically sexed sperm *Arch. Tierz., Dummerstorf, Polonia*. <https://aab.copernicus.org/articles/49/133/2006/aab-49-133-2006.pdf>
- Machado, G. M., Carvalho, J. O., Filho, E. S., Caixeta, E. S., Franco, M. M., Rumpf, R. y Dode, M. A. N. (2009). Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 71(8), 1289–1297. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.002>
- Martínez, Y. (2013). Análisis de la morfoloía ovocitaria en bovina previa a fecundación in vitro [Tesis de posgrado]. Universidad de Oviedo, España. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/17398/TFM%20Yaiza%20Martinez.pdf;jsessionid=9A2DD761A566A5FDA7467C89A151B782?sequence=1>
- Mora Muñoz, V. A. (2018). Uso del semen sexado en bovinos seminario de profundización [Tesis de pregrado]. Universidad Cooperativa de Colombia Villavicencio, Colombia. <https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/84c4a59a-03e8-488c-be2e-8a4971e48cb1/content>

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2024). La ganadería y el medio ambiente. <https://www.fao.org/livestock-environment/es>
- Oses, M. V., Teruel, M. T. y Cabodevila, J. A. (2009). Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *Revista Veterinaria*, 20(2), 138. <https://doi.org/10.30972/vet.2021867>
- Promthep, K., Satitmanwiwat, S., Kitiyanant, N., Tantiwattanakul, P., Jirajaroenrat, K., Sitthigripong, R. y Singhapol, C. (2015). Practical use of percoll density gradient centrifugation on sperm sex determination in commercial dairy farm in Thailand. *Indian Journal of Animal Research*. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.18805/ijar.8427>
- Romo García, S. (2016). Recomendaciones prácticas para el uso de semen y embriones sexados. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. <https://www.ganaderia.com/destacado/Recomendaciones-practicas-para-el-uso-de-semen-y-embryones-sexados>
- Romo García, S. y Álvarez Gallardo, H. (2019). Tecnología para la producción de embriones in vitro con semen sexado de última generación a partir de vacas élite, para la producción de gestaciones y partos gemelares de sexo femenino: contribución a la multiplicación del hato lechero nacional. <https://www.ganaderia.com/destacado/tecnologia-para-la-produccion-de-embryones-in-vitro-con-semen-sexado-de-ultima-generacion-a-partir-de-vacas-elite-para-la-produccion-de-gestaciones-y-partos-gemelares-de-sexo-femenino-contribucion-a-la-multiplicacion-del-hato-lechero-nacional>
- Rosete Fernández, J. V., Álvarez Gallardo, H., Urbán Duarte, D., Fragoso Islas, A., Asprón Pelayo, M. A., Rios Utrera, A., Pérez Reynozo, S. y La Torre Sánchez, J. F. de (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 12, 39–78. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>
- Seidel, G. E. (1981). Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4480), 351–358. <https://doi.org/10.1126/science.7194504>
- Thomas, J. M., Locke, J. W. C., Vishwanath, R., Hall, J. B., Ellersieck, M. R., Smith, M. F. y Patterson, D. J. (2017). Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology*, 98, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.018>
- Wit, A. A. de, Wurth, Y. A. y Kruij, T. A. (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science*, 78(5), 1277–1283. <https://doi.org/10.2527/2000.7851277x>
- Xu, J., Chaubal, S. A. y Du, F. (2009). Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology*, 71(1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.012>

Anexos

Anexo A

Materiales utilizados



Anexo B*Dia -1 Lavado de ovarios*

Anexo C

Día -1 Aspiración folicular mediante el uso de jeringas

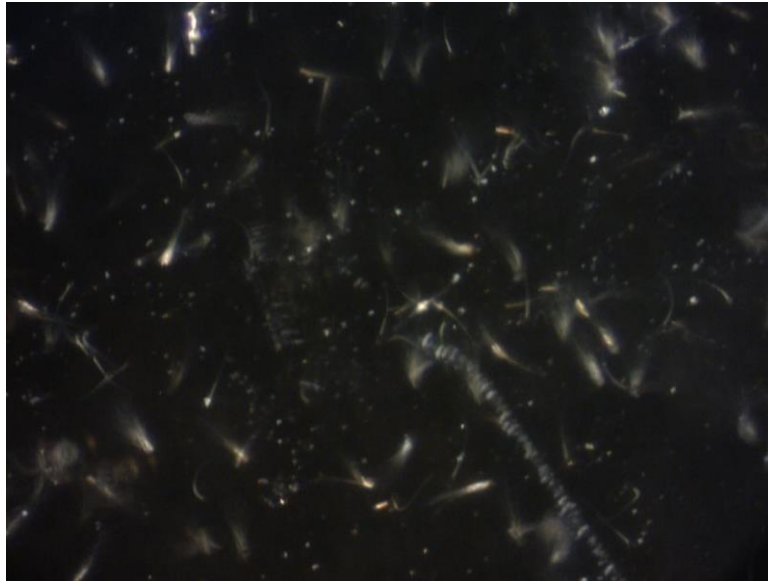


Obtención de oocitos

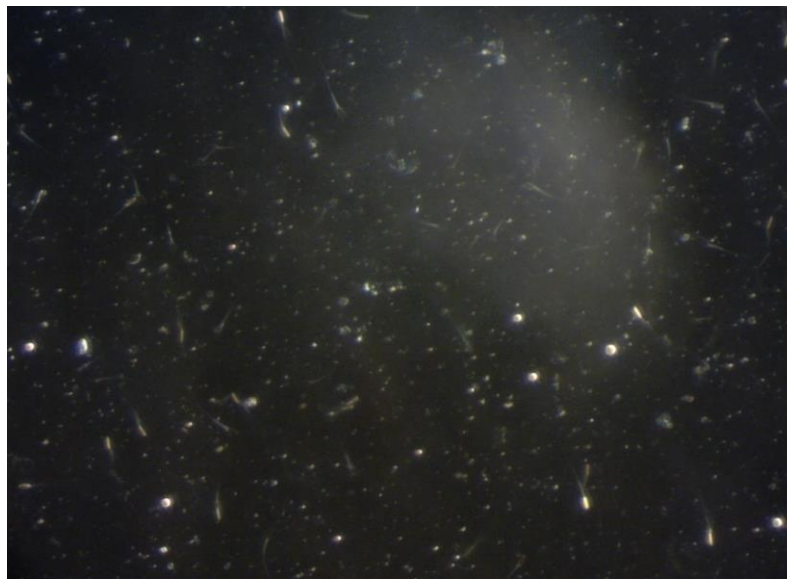


Anexo D

Semen convencional (no sexado)



Semen sexado



Anexo E

Día 0 proceso de co-cultivo en fertilización

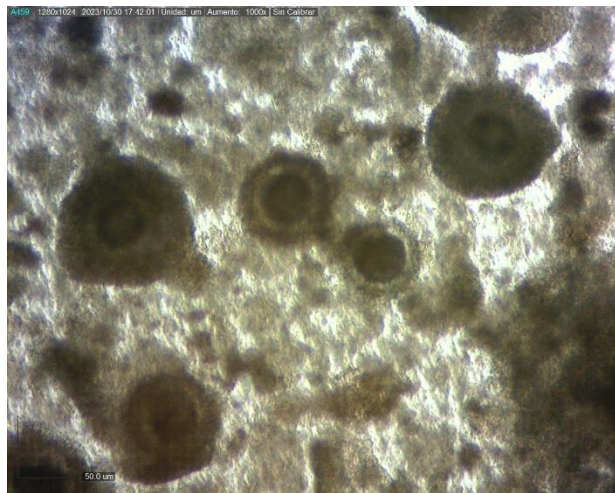


Anexo F

Día 0 Percoll

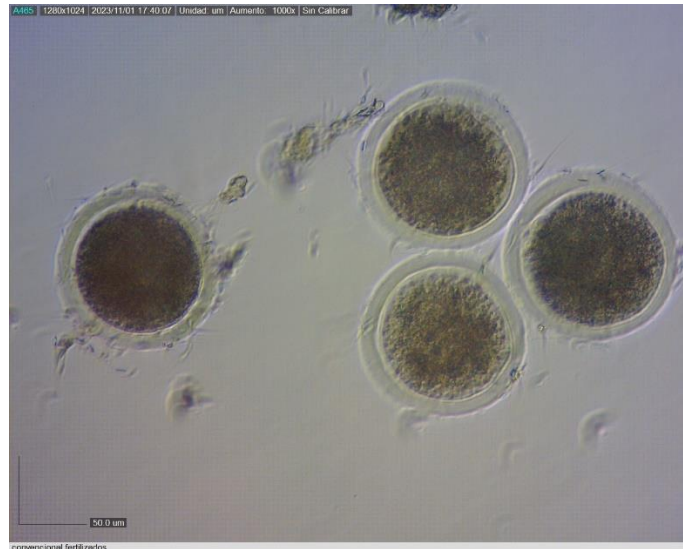


Oocitos rodeados por células del cumulus oophorus



Anexo G

Día 1 semen convencional



Día 1 semen sexado



Anexo H

Día 3 semen convencional



Día 3 semen sexado



Anexo I*Día 7 blastos semen convencional**Día 7 blastos semen sexado*