

PASADO PRESENTE Y FUTURO DE LA FECUNDACIÓN *IN-VITRO* EN VENEZUELA Y EL MERCOSUR (Revisión)

(Present past and future of the in vitro fecundation in Venezuela and the Mercosur. Review)

D'Endel D'Enjoy, Noris Roa

Fisiología de la Reproducción Animal. Producción Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Maracay. Venezuela. denjoyd@inia.gob.ve

RESUMEN

La Fecundación *in vitro* (FIV) constituye una biotecnología ampliamente desarrollada en el mundo, que ha traído beneficios al progreso genético de la ganadería. En Venezuela se ha utilizado esta biotecnología con fines de investigación, permitiendo estandarizar las condiciones de campo y de laboratorio, logrando resultados alentadores por el nacimiento de becerros en el siglo XXI producidos *in vitro* por científicos Venezolanos. Sin embargo, aún deben superarse las barreras que existen para el desarrollo a gran escala de la producción de embriones *in vitro*, para lo cual debe hacerse una fuerte inversión en infraestructura, equipos y personal técnico. El objetivo de este trabajo será presentar una breve revisión de los desafíos que tiene la aplicación de la Fecundación *in vitro* para Venezuela en el presente y futuro.

Palabras clave: Fecundación *in vitro*, biotecnología reproductiva, Venezuela.

ABSTRACT

The in vitro fecundation (IVF) constitutes a widely developed biotechnology in the world, which has brought benefits to the genetic progress of livestock. In Venezuela has used this biotechnology with purpose of investigation, what has allowed to standardize the conditions of field and of laboratory, attaining encourages results by the birth of calf in the 21st century produced in vitro By Venezuelan scientists. However, still must be overcome the barriers that exist to develop large-scale production of in-vitro embryos, which must be a strong investment in infrastructure, equipment and technical staff. Like country have fortresses that could allow us in a near future, apply to wide scale the production *in vitro*, to attain surpass the barriers that involves the development of the FIV. The

objective of this work is to present a brief review of the challenges that has the application of fertilization in vitro for Venezuela in the present and future.

Key words: *In vitro* fecundation, reproductive biotechnology, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 50 años, la producción animal ha evolucionado a través de la aplicación de biotecnologías reproductivas, siendo en las últimas décadas la fecundación *in vitro* (FIV) una de las biotecnologías que adquirido mayor importancia debido a las amplias ventajas que ofrece¹. En sus inicios la FIV permitió estudiar los factores involucrados en la fecundación, capacitación espermática, maduración del ovocito, interacción entre gametos, además de procesos de desarrollo y diferenciación del embrión^{2,3}. En la actualidad es utilizada con fines de multiplicar *in vitro* líneas de animales genéticamente superiores⁴, a través de la obtención de ovocitos de hembras donadoras (aspiración folicular), o a partir de ovarios de hembras postmorten. La alta tasa de ganancia genética que se logra mediante la aplicación de la FIV, permite acortar los intervalos generacionales⁵ con lo que se logra un mayor progreso genético en las poblaciones en las que es aplicada. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) señala que el comercio de semen y embriones representa menor riesgo en la transmisión de enfermedades que a través de la comercialización de animales reproductores. A pesar de sus ventajas, la viabilidad de la FIV se ha visto limitada por: una baja tasa de recuperación de ovocitos (70%), una baja eficiencia en la producción de embriones (10–40%), tasas de gestación entre 30–40% debido a

alteraciones en el desarrollo de los embriones y además pérdidas por la alta mortalidad perinatal. Lo que conlleva a una eficiencia global que no supera el 10%. La alta inversión requerida por esta biotecnología en infraestructura, equipos y personal técnico hace que su viabilidad económica esté fuertemente influenciada por la escala de uso, y consecuente demanda de animales genéticamente superiores. Por todo esto, en Venezuela el uso de la FIV en el campo de la producción animal representa un fuerte desafío, cuyo éxito depende del fortalecimiento de los laboratorios que actualmente han desarrollado investigación en el país, la capacitación de talento humano en el desarrollo de la biotecnología, integración de empresas ganaderas para su aplicación; por lo que se requiere la inversión de capital público y privado, que acompañen políticas de estado acertadas.

LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN VENEZUELA Y EL MUNDO

Desde el nacimiento del primer becerro producto de la técnica de FIV en 1981⁶ se han logrado un considerable progreso en el desarrollo de la técnica para la producción de embriones bovinos *in vitro*. En Venezuela el inicio de trabajos con fines de investigación en fecundación *in vitro*⁷ han permitido estandarizar la técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos, haciendo factible el desarrollo de la FIV a nivel de Laboratorio. Para el año 2000, a través de un convenio entre la Universidad de Georgia (Athens, Georgia, USA), La Universidad del Zulia (Maracaibo, Zulia, Venezuela), la empresa VIATECA (Villa del Rosario, Zulia, Venezuela) y ganaderos comerciales de la región zuliana, se implementa en Venezuela un programa para la producción de mestizos F1 (Brahman x Holstein), mediante la producción y congelación de embriones *in vitro* en Estados Unidos, y transferidos en Venezuela por técnicos de La Universidad del Zulia y VIATECA (400 transferencias), alcanzando tasas de preñez comercialmente viables (35–55%) con embriones producidos en medio suplementado con suero fetal bovino⁸. El nacimiento de becerros producidos *in vitro* en Venezuela: “Chinco” (noviembre de 2000), “Eva” (junio de 2007) utilizando semen

sexado para la fecundación de los ovocitos, además del nacimiento en 2011 de la primera becerro producida por el Laboratorio de Fecundación *in vitro* de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia en colaboración con la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, marcan en el país el inicio del desarrollo de la FIV como herramienta para la producción de animales genéticamente mejorados. En países suramericanos como Brasil, Colombia y Argentina, la técnica de FIV ha encontrado nichos de desarrollo comercial⁹, por lo que hoy en día cuentan con ganaderías puras o mestizas, además talento humano preparado en las mejores universidades del mundo, logrando entusiasmar el interés privado para el aprovechamiento de diversas biotecnologías reproductivas. A nivel mundial en el año 2002 se produjeron mediante FIV 160.695 embriones, de los cuales 51.063 fueron producidos en Sur América¹⁰. Para el 2005 se duplicó la producción de embriones *in vitro* a nivel mundial a 330.647¹¹ y nacieron más de 200.000 becerros mediante FIV¹², teniendo una fuerte influencia la producción de embriones en países suramericanos con 143.916 embriones producidos. Actualmente Brasil lideriza la producción de embriones *in vitro* a nivel mundial, siendo reportada una producción de 349.171 (79%) embriones, en su mayoría transferidos en fresco (303.168). Otro de los países integrantes del MERCOSUR como Argentina, produce en la actualidad 2.308 embriones mediante FIV, transfiriendo en fresco el 70% (1.613) de los embriones producidos¹³. Estos países no comercializan sus embriones a nivel internacional, sino reflejan un fuerte interés en mejorar su genética mediante la transferencia masiva de embriones producidos *in vitro*. Por otra parte, han sacado provecho a la limitante que ha tenido la criopreservación de embriones producidos mediante FIV, al congelar 28.793 que pueden formar parte de un banco de germoplasma para su utilización estratégica. Países como Colombia, México y Costa Rica, a través de franquicias brasileñas han importado genética para el desarrollo de la FIV. Siguiendo el ejemplo de estos países quienes han adoptado producción de embriones *in vitro*, en Venezuela a través de Embrioven C.A, en alianza

con In Vitro Brasil, una de las empresas de gran trayectoria y relevancia en la producción de embriones en el vecino país, están produciendo embriones *in vitro* y a pesar de no reportar oficialmente los resultados alcanzados hasta el momento, han tenido una fuerte influencia en los productores venezolanos para la adopción de dicha biotecnología como estrategia para el mejoramiento genético de sus rebaños.

VENTAJAS DE LA FIV PARA EL DESARROLLO DE LA GANADERÍA BOVINA

La FIV es una biotecnología versátil que nos permite el aprovechamiento de hembras de alto valor genético que no responden a tratamientos superovulatorios (MOET), o que mueren repentinamente⁸. Hace posible además la utilización de hembras que por causas no genéticas son estériles y deben ser eliminadas de los sistemas productivos¹⁴. Para la producción de embriones *in vitro* se pueden obtener ovocitos mediante la colecta de ovarios de hembras sacrificadas^{4,7} o mediante la aspiración transvaginal de folículos guiada por ultrasonido (OPU)¹⁵ de vacas de alta calidad genética. Esto hace que la FIV garantice la producción de un elevado número de embriones¹⁶ de una misma donadora. La OPU representa una herramienta importante para la producción de embriones *in vitro* ya que permite la obtención de ovocitos provenientes de hembras pre-púberes¹⁷, seniles¹, hembras en el primer tercio de gestación y que no responden a la súper ovulación¹⁸, ofreciendo alternativas para la eficiencia de la FIV. Por todo esto se han logrado producciones de hasta 80–100 crías/año¹⁹, haciendo que esta tecnología tenga la potencialidad de masificar la producción y difusión de mejor genética en rebaños a nivel nacional. A esta asociación de tecnologías se ha agregado el semen sexado²⁰, que permite predeterminedar el sexo de los embriones y por lo tanto de la cría producidas por FIV²¹ obteniéndose resultados satisfactorios. Por otra parte el uso de la FIV ha permitido hacer más eficiente la utilización de pajuelas de semen ya que se puede fecundar mayor cantidad de ovocitos que mediante la técnica de IA. Sin embargo, a pesar de las regulaciones y fuertes controversias que

existen sobre el uso de la clonación y transgénesis, estas biotecnologías dependen de la FIV para su desarrollo²². El intercambio de genética a nivel mundial, implica el costo de hembras donadoras que tienen un precio aproximado de tres mil dólares, mientras que el precio de una hembra mediante la aplicación de FIV representa entre 15–20% del costo de una reproductora. Asimismo, el comercio de semen y embriones producidos *in vitro*, representa menor riesgo en la transmisión de enfermedades que la comercialización de animales vivos según lo establece la OIE²³. Todo lo anteriormente expuesto hace que la FIV genere márgenes de ganancia productiva (número de embriones y preñeces) y económica al compararla con otras tecnologías.

FORTALEZAS PARA LA APLICACIÓN DE LA FIV EN VENEZUELA

En la actualidad Venezuela cuenta con talento humano, infraestructura y la capacidad económica necesaria para dar inicio a un programa de producción *in vitro* de embriones, con lo cual se alcanzarían mejoras sustanciales a mediano plazo en el valor genético y productividad del rebaño nacional. Las universidades públicas con mayor trayectoria en el país en materia de investigación, han invertido en el desarrollo de laboratorios para la producción *in vitro* de embriones (UCV, FCV–IRA; UCLA, FCV–LEEM; LUZ, FCV–UNIBIO), además de contar con talento humano capacitado en el área de la FIV. Esto permite conformar grupos de trabajo para el desarrollo experimental de la técnica a través de trabajos de investigación enfocados a estandarizar protocolos de preparación de medios, maduración de ovocitos, capacitación espermática, fecundación *in vitro*, producción y criopreservación de embriones. Los estudios preliminares en los que han nacido los primeros becerros *in vitro* en Venezuela, permite afirmar que existen suficientes experiencias experimentales, a campo y comerciales, para prestar servicio a los productores agropecuarios²⁴ y contribuir al futuro desarrollo comercial de la FIV como herramienta fundamental en el desarrollo genético de la ganadería venezolana. Las empresas ganaderas

además de tener rebaños comerciales, forman parte de las asociaciones a nivel nacional donde se encuentran identificados animales puros de alto valor genético (ASOCEBÚ, SEPROCEBÚ, ASOCRICA), lo que potencialmente permite estimular la inversión privada para la producción masiva de embriones y contribuir con el desarrollo de la ganadería de carne, doble propósito y para la producción de leche del país.

DEBILIDADES QUE ACTUALMENTE LIMITAN EL DEARROLLO DE LA FIV EN VENEZUELA

A pesar de las fortalezas señaladas para el desarrollo de la FIV en Venezuela, debe hacerse una serie de ajustes que permitan superar las debilidades que han limitado en el mundo el desarrollo de la producción *in vitro* de embriones en forma comercial²⁵. La principal limitación está basada en la propia calidad de los embriones: baja sobrevivencia embrionaria (40%), baja resistencia a la congelación, alta tasa de abortos (50%), anomalías congénitas, alta mortalidad perinatal. La disminución en el financiamiento agrícola por parte del Ministerio de Agricultura y Tierras en su Memoria y cuenta 2010, para la producción animal durante el periodo 2009-2010 al pasar de una inversión de 1.188.791.988 BsF a 429.869.844 BsF, hace que se pierda cualquier estímulo que pudiera existir el sector ganadero privado para invertir en mejoras del manejo nutricional, sanitario, reproducción y genética, necesarios para la implementación de las biotecnologías reproductivas (Inseminación Artificial, Transferencia de Embriones y Fecundación *in vitro*). En la década de los años '60 el Registro Oficial de Producción de Leche (ROPL) permitió compilar información en todo el país, a través del Ministerio de Agricultura y Cría (MAC), en convenio con las facultades de veterinaria (UCV-LUZ)²⁶. Hoy en día el Programa Integral para el Desarrollo Lechero del Estado Lara (PIDEL) aporta información valiosa de los rebaños lecheros que forman parte del programa, pero se hace necesaria la creación de una red nacional de información que permita identificar los animales genéticamente superiores. La alta inversión que

requiere esta biotecnología en infraestructura, equipos y formación de talento humano hace que su viabilidad económica sea dependiente de una fuerte inversión de capital, que solo es justificada por el uso de esta biotecnología a gran escala, y de la demanda de animales genéticamente superiores que hoy necesita el país. Los laboratorios existentes en las instituciones públicas, requieren fortalecerse mediante la adquisición y mantenimiento de equipos, obtención de suministros, además de la capacitación de personal necesario no solo para la investigación, sino además para la producción comercial de embriones. La capacitación de personal requiere de seis meses a un año, debiendo tener conocimientos básicos en ciencias biológicas para facilitar su entrenamiento²¹. Similar a lo reportado por el Censo Agrícola 2007, la Federación Nacional de Ganaderos, en el 2012 reporta la existencia de 12.000.000 de cabezas de ganado, con una producción anual de 1.500 millones de litros de leche. Esto refleja un déficit de 14.000.000 de cabezas para aumentar la producción a 4.000 millones de litros anuales de leche necesarios para alcanzar un consumo per cápita de 130 litros. El aumento del rebaño nacional permitiría favorecer la disponibilidad de hembras utilizadas como receptoras de embriones, lo cual constituye hoy en día una limitante para el trasplante de embriones *in vivo* e *in vitro*. Todas estas limitantes ponen en una posición desfavorable las intenciones de dirigir estrategias destinadas al uso comercial de la producción de embriones *in vitro*, lo que limita el desarrollo de proyectos destinados a masificar la FIV, de una manera sustentable.

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES MEDIANTE FIV EN VENEZUELA UN FUERTE DESAFIO PARA EL PRESENTE Y FUTURO

La FIV como biotecnología nos brinda la capacidad de producir embriones bovinos masivamente. Un laboratorio de pequeñas dimensiones (50 m²) permite con sólo tres técnicos, procesar 1.000 ovocitos por ciclo. Llevando la producción del laboratorio entre 2-3 ciclos/semana, se pueden

Pasado presente y futuro de la fecundación *in-vitro* en Venezuela y el MERCOSUR / D' Enjoy y Roa.

procesar aproximadamente 2.000–3.000 ovocitos semanales²⁷. En Venezuela actualmente existen tres laboratorios de referencia para la producción *in vitro* de embriones bovinos con ubicación estratégica en el país (Zulia-LUZ; Lara-UCLA; Aragua-UCV), dedicados principalmente a la investigación y extensión. Si los mismos se destinan a la producción comercial de embriones *in vitro*, se podrían procesar entre 6.000–9.000 ovocitos/semana y considerando que entre 20–40% de estos pueden llegar a la fase de blastocito, tenemos un potencial de producción de 1.800–2.700 embriones/semana, generando aproximadamente 1.100 gestaciones promedio/semana. Esta capacidad de producción supera las expectativas con respecto al uso de las biotecnologías que anteceden a la FIV en términos de número de crías por vaca/año, siendo señalado que mediante IA una vaca puede producir un becerro/año, mientras que utilizando MOET, puede producir entre 20-25 crías/año. La combinación de OPU/FIV, permitiría que la misma vaca pueda producir entre 80 a 100 crías/año¹⁹, por lo que ninguna otra tecnología o su combinación sería capaz de producir semejante cantidad de descendientes. Sin embargo tener estos resultados requiere una planificación y organización de trabajos basados en la disponibilidad de hembras donadoras y receptoras, teniendo en cuenta las capacidades técnicas-económicas óptimas. A nivel internacional existen normativas sobre la producción y comercialización de embriones que deben cumplirse tal y como lo establece la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS), la Organización Mundial de la Salud Animal OIE y el Mercado Común del Sur (MERCOSUR). Esta última instancia señala que el país exportador de los embriones debe ajustarse a la Norma sanitaria para el intercambio de bovinos y bubalinos entre los Estados Partes del MERCOSUR²⁸. Para poder producir embriones de exportación la hembra donadora debe ser originaria y procedente de rebaños en el que durante los (90) días anteriores a la recolección no se hayan comprobado signos clínicos de: Paratuberculosis, Tuberculosis, Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR/IPV), Trichomoniasis Campylobacteriosis, Diarrea Viral Bovina, Brucelosis y Lengua Azul.

Estos mismos requisitos sanitarios deberán cumplirse en el establecimiento en el cual se halla situada la unidad de recolección. Por otra parte no deberán haberse constatado casos de Fiebre Aftosa o Estomatitis Vesicular en los noventa (90) días previos a la colecta en el establecimiento de origen de la donadora, en el establecimiento de la unidad de recolección. En el momento de la recolección, las hembras donantes no deberán presentar signos clínicos de enfermedad infecciosa alguna y 30 días posteriores a la recolección de los embriones, deben someterse a las pruebas diagnósticas para Brucelosis, Tuberculosis, Estomatitis Vesicular, IBR, Lengua Azul, con resultado negativo, o debe presentar el certificación oficial de haber efectuado el lavado de los embriones con tripsina según las normas recomendadas por la IETS. Para el caso de los países firmantes de este convenio como libres de Fiebre Aftosa y/o de Lengua Azul, los mismos se reservan el derecho de solicitar al país exportador las pruebas diagnósticas negativas a fin de poder conservar el status sanitario reconocido por la OIE. Para el caso de la importación de un embrión en una hembra receptora, se exigirán para la misma todos los requisitos sanitarios referentes a la importación de reproductores de acuerdo a la Norma SA/ Importación de Bovinos y Bubalinos. La consideración de todos estos aspectos, genera un fuerte desafío para la producción de embriones *in vitro* en Venezuela, por lo que debe hacerse un profundo análisis de las fortalezas, oportunidades y debilidades que permitan hacer una realidad la producción de embriones mediante FIV con miras a mejorar la genética del rebaño nacional a través de su masificación.

CONCLUSIONES

La masificación de la FIV como biotecnología reproductiva en Venezuela representa un fuerte desafío por requerir una alta inversión en infraestructura, equipos y personal técnico. Su viabilidad económica depende de la demanda existente de animales genéticamente superiores, determinando su factibilidad y sustentabilidad el uso a gran escala. Los productores ganaderos registrados en asociaciones (ASOCEBÚ,

SEPROCEBÚ, ASOCRICA) pueden brindar información importante a través de registros e inventarios de rebaños a nivel nacional para identificar hembras y machos mejoradores que pueden ser utilizados para multiplicación de su genética. El estado debe promover políticas que estimulen al sector ganadero público y privado a generar cambios en su cultura de producción, apuntando la inversión hacia la tecnificación de sus unidades de producción, lo que garantiza la implementación de las biotecnologías reproductivas que hoy se usan en el mundo hasta la adopción de la FIV como biotecnología que genera el mayor progreso genético de los rebaños. La estandarización de técnicas de laboratorio, orientadas a vencer los aspectos negativos que existen en la calidad de los embriones *in vitro*; sumado a los buenos resultados en la práctica de la transferencia de embriones *in vitro*, permiten repetir los resultados exitosos que hasta el momento han tenido trabajos referenciales en los que se ha logrado nacimientos de becerros mediante FIV en Venezuela, haciendo realidad el uso masivo de esta biotecnología con miras a dar respuesta a la actual demanda de carne y leche existente en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹GALLI C; CROTTI G; NOTARI C; TURINI P; DUCHI R; LAZZARI G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**. 55:1341-1357.
- ²EDWARDS R; BAVISTER BY; STEPTOE P. 1969. Early stages of fertilization *in vitro* in human oocytes matured of *in vitro*. **Nature**. 22: 1632.
- ³NIWA KY; CHANG MC. 1975. Effect of pretreatment of rat spermatozoa with high concentrations of NaCl on sperm capacitation and fertilization of eggs in vitro. **Biology of Reproduction**. 13: 187-189.
- ⁴FERNÁNDEZ A; DÍAZ T; MUÑOZ G. 2007. Producción *In vitro* de Embriones Bovinos. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UCV**. 48(1): 51-60.
- ⁵HANSEN PJ, BLOCK J. 2004. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. **Reproduction Fertility and Development**. 16:1-14.
- ⁶BRACKETT BG; BOUSQUET D; BOICE ML; DONAWICK WJ; EVANS JF; DRESSEL MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**. 23:147-158.
- ⁷FERNÁNDEZ A. 1996. Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. **Tesis de Maestría, Postgrado en Reproducción Animal y Tecnología de la Inseminación Artificial**, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela, 87 p
- ⁸HERNÁNDEZ HJ. 2002. La fertilización *in vitro* como herramienta en el mejoramiento de la Ganadería Doble Propósito. **XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal**. 22 al 26 de octubre. Valera ULA-Trujillo. P 1-8.
- ⁹NASSER LF, REZENDE LF, BO GA, BARTH A. 2008. Induction of parturition in Zebu-cross recipients carrying *in vitro*-produced *Bos indicus* embryos. **Theriogenology**. 69:116-123.
- ¹⁰THIBIER M. 2002. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. IETS (International Embryo Transfer Society). **Data Retrieval Committee Annual Report**. 12-20.
- ¹¹THIBIER M. 2006. IETS (International Embryo Transfer Society). **Data retrieval committee annual report**. Embryo Transfer Newsletter 24:12-18.
- ¹²HERNANDEZ HJ, SIRISATHIEN S, BOSCH P, CHO HS, LOTT JD, HAWKINS LL, HOLLETT RB, COLEY SL, BRACKETT BG. 2002. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced *in vitro* in chemically defined media. **Animal Reproduction Science**. 69:151-158.
- ¹³PERRY G. 2012. IETS (International Embryo Transfer Society). **Data Retrieval Committee annual report**. 1-23.
- ¹⁴RATTO, M.; BERLAND, M.; WOLTER, M.; MATAMOROS R. 1999. Bovine embryo development produced by *in vitro* fertilization cultured with oviductal cell or conditioned.

Pasado presente y futuro de la fecundación *in-vitro* en Venezuela y el MERCOSUR / D' Enjoy y Roa. _____

- 365-383. medium and transfer to recipients. **Archivos de Medicina Veterinaria**. 31(1).
- ¹⁵NAVA-TRUJILLO HA, HERNANDEZ-FONSECA HJ. 2005. Aspiración folicular transvaginal. En: **Manual de Ganadería Doble Propósito**. C González-Stagnaro, E Soto-Belloso (eds). Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo, Venezuela VIII (3):611-614.
- ¹⁶GADEA J; RUIZ, PS.; COY, A.; POTO, A.; PEINADO, B.; ROMAR, R.; CAMPOS, I.; ZUBILLAGA, O. 1998. Fecundación *in vitro* con semen congelado en la especie porcina. **Archivos de Zootecnia**. 47: 299-304.
- ¹⁷TANEJA M; BOLS PE; VAN DE VELDE A; JU JC; SCHREIBER D; TRIPP MW. 2000. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**. 62:206-213.
- ¹⁸KRUIP TH; BONI R; WURTH YA; ROELOFSEN MWM; PIETERSE MC.1994. Potential use of ovum pick up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**. Vol: 43 p 259.
- ¹⁹VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**. 65:914-925.
- ²⁰GARNER DL; SEIDEL GE. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**. 69:886-895.
- ²¹HERNÁNDEZ HJ; PIRELA A. 2011. Retos para la aplicación de la producción *in vitro* de embriones en la Ganadería Doble Propósito. En: **Innovación & Tecnología de la Ganadería Doble Propósito**. C González-Stagnaro, N Madrid-Bury, E Soto Belloso (eds). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo Venezuela. LXXXI: 812-821.
- ²²HANSEN PJ. 2006. Realizing the promise of IVF in cattle: an overview. **Theriogenology**. 65:119-125.
- ²³ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2007. **Código sanitario para los animales terrestres**. Decimosexta edición.
- ²⁴HERNÁNDEZ HJ. 2005. Fecundación *in vitro*. En: **Manual de Ganadería Doble Propósito**. C. González-Stagnaro, E. Soto-Belloso (eds.) Ediciones Astro Data, S.A. Maracaibo-Venezuela. VIII: 615-619.
- ²⁵HASLER JF; HENDERSON WB; HURTGEN PJ; JIN ZQ; McCAUELY AD; MOWER SA; NEELY B; SHUEY LS; STOKES JE; TRIMMER SA. 1995. Production, freeing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving result. **Theriogenology**. 43:141-152.
- ²⁶CERUTTI F. 1997. Un programa de mejoramiento genético para la producción de leche en ambiente tropical: resultados de los primeros cuatro años. En: **Simposio "Utilización de Razas y Tipos de Bovinos creados y Desarrollados en Latinoamérica y el Caribe**. IX Congreso Venezolano de Zootecnia. 40-53.
- ²⁷HERNÁNDEZ HJ; LANDINEZ JA. 2008. Eficiencia de la fecundación *in vitro* y biotecnologías complementarias en la producción de bovinos. En: **Manual de Ganadería Doble Propósito**. C González-Stagnaro, E Soto Belloso (eds). Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo Venezuela. VIII: 773-782.
- ²⁸MERCOSUL\GMC\RES N° 67/94. **Normas sanitárias que os centros de produção de embriões bovinos e bubalinos deverão cumprir para sua habilitação**. Art. 13 do Tratado de Assunção, o Art. 10 da Decisão N° 4/91 do Conselho do Mercado Comum, a Resolução N° 91/93 do Grupo Mercado Comum e a Recomendação N° 18/94 do SGT N° 8 "Política Agrícola".