

# Influence of the subspecies of the donator cow in the quantity of total embryos obtained *in vitro*: a retrospective study \*

*Influencia de la subespecie de la donadora en la cantidad de embriones totales obtenidos in vitro: estudio retrospectivo*

*Influência da subespécie da vaca doadora na quantidade de embriões totais obtidos in vitro: estudo retrospectivo*

Rubén Uribe Valderrama <sup>1\*</sup>, MV, MSc; Juliana Mora Echavarría<sup>2</sup>, TTPP; Daniela Ramírez <sup>3</sup>, MVZ.

\* Autor para correspondencia: Rubén Darío Valderrama, Calle 35 #24- 24 Floridablanca. Santander. Colombia. E-mail: rubendario10@hotmail.com

<sup>1</sup> Grupo investigación INCA - CES, Universidad CES.  
Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad CES.

<sup>2</sup> Grupo de investigación GIVET, Facultad de Medicina Veterinaria.  
Corporación Universitaria Lasallista. Carrera 51 # 118 sur-57 Caldas. Colombia.

<sup>3</sup> Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria,  
Universidad CES, Calle 10A No 22-04, Medellín, Colombia.

(Recibido: 20 de Febrero de 2011 ; aceptado: 02 de Agosto de 2011)

## Abstract

From the many years of transfer records of embryos produced *in vitro* at the genetics center in the municipality of San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia, we examined retrospectively if there was a relationship between the number of viable oocytes and embryos produced by the donors. Depending on the race, we sought to determine whether there is an influence by the donor. The variables analyzed were: the bull, race, batch, and reproductive history of the donors, all of which were in similar health and nutritional conditions. The evaluation of the results was carried out with the Chi-Square test statistical model. In order to compare between the percentage of viable oocytes and the percentage of embryos, an analysis of variance (ANOVA) was performed as well as a Fischer test, with a confidence interval of 95% and a p-value of  $p > 0.05$ . Statistically significant differences were found in the production of embryos (40% vs 29%) *taurus* and *indicus*, respectively. The conclusion is that *taurus* donors produce greater numbers of embryos than *indicus* donors.

\*Para citar este artículo: Valderrama RD, Mora J, Ramírez D. 2011. Influencia de la subespecie de la donadora en la cantidad de embriones totales obtenidos *in vitro*: estudio retrospectivo. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (2): 45-52

## Key words

*Donor, embryos in vitro, indicus, follicular aspiration, taurus.*

## Resumen

A partir de los registros de transferencia de embriones producidos *in vitro* de tantos años de la central genética en el municipio de San Pedro de los Milagros Antioquia – Colombia, se buscó retrospectivamente si existía una relación sobre la cantidad de ovocitos y embriones viables producidos por las donadoras. Dependiendo de la raza, se buscó determinar si existe una influencia de la donante. Las variables analizadas fueron: el toro, la raza, el lote, la historia reproductiva de las donadoras, las cuales se encontraban en iguales condiciones de manejo, tanto sanitarias y nutricionales. La evaluación de los resultados se realizó mediante el modelo estadístico de Chi-cuadrado. Para la comparación entre el porcentaje de ovocitos viables y el porcentaje de embriones producidos se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Fisher con un intervalo de confianza del 95% y un valor de  $p > 0.05$ . Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de embriones (40% vs 29%), *taurus* e *indicus*, respectivamente. Se concluye, que las donadoras *taurus* producen mayor número de embriones que las *indicus*.

## Palabras clave

*Donante, embriones in vitro, indicus, punción folicular, taurus.*

## Resumo

A partir dos registros de transferência de embriões produzidos *in vitro* nos muitos anos da central genética no município de San Pedro de los Milagros, Antioquia- Colômbia procuramos retrospectivamente se há uma relação entre a quantidade do número de oócitos viáveis e embriões produzidos por doadores. Dependendo da raça, buscou-se determinar se há uma influência do doador. As variáveis analisadas foram: o touro, a raça, o lote, a história reprodutiva dos doadores, os quais encontravam-se nas mesmas condições de manejo, saúde e nutrição. A avaliação dos resultados foi realizada utilizando o modelo de teste estatístico Chi-quadrado. Para a comparação entre a porcentagem de oócitos viáveis e a porcentagem de embriões produzidos foram realizados um teste pela análise de variância (ANOVA) e um teste de Fisher, com intervalo de confiança de 95% e um valor de  $p > 0.05$ . Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na produção de embriões (40% vs 29%), *taurus* e *indicus*, respectivamente. A conclusão é que os doadores *taurus* produzem um número maior de embriões que os doadores *indicus*.

## Palavras chave

*Doadores, embriões in vitro, indicus, punção folicular, taurus.*

## Introducción

La biotecnología reproductiva es una herramienta útil en los sistemas de producción pecuaria de Colombia, una variada gama de técnicas y tecnologías están en oferta contante para la mejora del hato nacional, entre las cuales se encuentra la producción de embriones *in vitro*. Este procedimiento permite multiplicar la descendencia de las hembras de alta calidad genética, acortando simultáneamente el intervalo generacional y facilitando diferentes actividades de mejoramiento genético, como la evaluación de la progenie y la comparación entre grupos de animales<sup>20</sup>.

En el mundo se han desarrollado diversos programas de producción *in vitro* de embriones bovinos y son numerosos los profesionales que están dedicados a esta biotecnología. Estos programas dependen en gran medida las razas que se trabajen tanto en *Bos taurus* como en *Bos indicus*, sin embargo dependiendo de las condiciones ambientales, trópico alto o bajo los resultados varían. Por consiguiente es importante registrar los detalles de trabajos locales, que sirvan como soporte técnico para el personal que se desempeña en esta actividad<sup>22</sup>.

El presente artículo expone el resultado del trabajo realizado en una central genética en el municipio de San Pedro de los Milagros, ubicado en el departamento de Antioquia - Colombia, en el cual se realizó una evaluación de la influencia de la donadora (*Bos taurus*, vs *Bos indicus*) en la cantidad de ovocitos totales, viables y porcentaje de embriones totales producidos *in-vitro*, provenientes de hembras manejadas bajo las mismas condiciones medio ambientales y usando el mismo protocolo para la producción de los embriones *in-vitro*.

## Materiales y métodos

### Metodología

Es un compendio del análisis de dos años de trabajo, estos datos fueron generados en el desarrollo del programa de PIV en la central genética bovina, con ellos se realizó un estudio observacional analítico de tipo transversal, (Análisis retrospectivo).

### Población

El trabajo se realizó entre los años 2005 y el 2007. Como donadoras se utilizaron hembras de la subespecie *Bos Indicus* (n= 148) y *Bos taurus* (n= 161); con edades entre los 4 a los 10 años, con una historia sanitaria, productiva y reproductiva normal.

### Ubicación del sistema de producción

La central genética se encuentra ubicada en el municipio de San Pedro de los Milagros, en el departamento de Antioquia, Colombia. Este municipio que se encuentra ubicado al norte de Antioquia. Cuenta con una temperatura de 14 °C, un piso térmico bosque húmedo Montano Bajo (bh-MB), con suelos ácidos y de textura franco arenosa<sup>20</sup>.

### Aval de comité de ética

Por el tipo de trabajo (análisis retrospectivo), no se utilizaron animales para esta investigación, únicamente se utilizaron los datos de los registros.

### Métodos de recolección

Para el desarrollo del trabajo, se tomó la información de registros previamente elaborados, de las hembras bovinas donantes, donde se analizó la consignación de los datos de punción folicular, fecundación *in vitro* y de producción *in vitro* de embriones. Para la evaluación del padre se utilizó la información impresa en las pajillas para identificar a cada uno de los animales usados con la donadora correspondiente.

### Protocolos utilizados

**Punción folicular.** Para la recolección de los ovocitos de las vacas donadoras se utilizó la técnica de aspiración folicular transvaginal guiada por ultrasonido, la cual se realizó por el mismo médico veterinario, con el fin de evitar posibles errores.

**Evaluación de ovocitos.** Luego de la aspiración, se buscaron con microscopio estereoscópico, los ovocitos.

Luego fueron lavados en medio Hepes Talp y seguidamente, se realizó la clasificación de estos para determinar su calidad, de acuerdo a la morfología de las células del cúmulo y las características del citoplasma<sup>13</sup>. Se utilizaron únicamente los ovocitos que poseían más de tres capas de las células de la granulosa y que presentaban un citoplasma homogéneo.

**Maduración in vitro.** Una vez seleccionar los ovocitos viables, se lavaron cuatro veces en medio Hepes Talp suplementado con 0.4% de Albumina Sérica Bovina. Luego se transfirieron diez ovocitos en microgotas de 50 µl del medio de maduración TCM-199 enriquecido hormonalmente con FSH (0,5 µg/ml), hormona luteinizante (LH: 0,5 µg/ml), 17 beta estradiol (E2:1 µg/ml), Piruvato de Sodio (0.25 mM) y 10% de suero fetal bovino (SFB), durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, y humedad del 95%<sup>11</sup>.

**Fecundación in vitro.** Los ovocitos previamente maduros, fueron lavados cuatro veces en medio Hepes Tap, para luego ser transferidos en el medio de fecundación. Después, se descongelaron dos pajillas de 0,25 ml de semen de un toro con fertilidad probada, en baño María a 37 °C por 35 segundos. Se utilizaron gradientes de Percoll (45 -90) para la separación de los espermatozoides vivos de los muertos, y extraer otros compuestos perjudiciales. Finalmente los espermatozoides móviles se obtuvieron por medio de centrifugación a 500 G por 30 minutos. El pellet resultante de este proceso fue resuspendido en medio de fecundación Fert Talp suplementado con haparina (2 µl/ml) y PHE (Penicilamina 2 mM, Hipotaurina 1 mM y 250 mM Epinefrina). Para la FIV, se incubaron por 18 horas los gametos, a una temperatura de 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, y humedad del 95%<sup>9</sup>.

**Cultivo de embriones.** Luego de la fecundación, los presuntos cigotos fueron lavados cuatro veces en medio Hepes Talp, para luego ser transferidos a medio de cultivo suplementado con 10% de SFB, donde permanecieron durante 7 a 8 días en condiciones ideales para su desarrollo (T:39 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad) .

## Análisis estadístico

Para la comparación entre los ovocitos totales entre las subespecies se realizó un análisis de Chi-cuadrado de igual forma para la comparación entre el porcentaje de ovocitos viables y el porcentaje de embriones producidos se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Fisher. Para todos los procesos de análisis, fue utilizado el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

## Resultados

Para el presente estudio, se colectaron, un total de 3135 ovocitos, de la subespecie *Bos taurus*, y en las hembras *Bos indicus*, se colectaron 3886 de gametos femeninos (Tabla 1). El número total de ovocitos es similar entre las subespecies, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, (p>0.05).

**Tabla 1.** Número total de ovocitos producidos por *Bos taurus* y *Bos indicus*

<i>Subespecie</i>	<i>Animales (n)</i>	<i>Ovocitos totales (n)</i>
<i>Bos taurus</i>	161	3135 <sup>a</sup>
<i>Bos indicus</i>	148	3886 <sup>a</sup>

Letras iguales significa que no existe diferencia estadística significativa (p>0.05).

De los datos obtenidos, se realizó el análisis del número de ovocitos totales y los ovocitos viables, observándose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los *Bos taurus* y *Bos indicus* (Tabla 1 y Tabla 2). Sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa (p< 0.05) entre la producción de embriones (40% vs 29%) entre las subespecies *Bos taurus* y *Bos indicus*, respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentaje total de ovocitos viables y porcentaje de Blastocistos producidos por *Bos taurus* y *Bos indicus*.

<i>Subespecie</i>	<i>Ovocitos totales (n)</i>	<i>Ovocitos viables (n)</i>	<i>Ovocitos viables (%)</i>	<i>Blastocistos (n)</i>	<i>Blastocistos (%)</i>
<i>Bos taurus</i> <i>Grupo A</i>	3135	2691	86% <sup>a</sup>	1084	40% <sup>a</sup>
<i>Bos indicus</i> <i>Grupo B</i>	3886	3154	81% <sup>a</sup>	923	29% <sup>a</sup>
<i>Total</i>	7021	5841	-	2007	-

Letras diferentes en las casillas, corresponden a que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).  
Letras iguales en las casillas corresponden, que no hay diferencias esta estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

## Discusión

### *Obtención total de ovocitos*

Para la variable obtención de ovocitos no se encontraron diferencias significativas entre las subespecies, estos resultados son similares a los obtenidos por Báez *et al.* (2010)<sup>2</sup>, donde de igual forma evaluaron el desempeño de vacas *Bos taurus* y *Bos indicus* y se obtuvieron similares números de ovocitos (106 vs 136), respectivamente.

Cabe anotar que el ganado *Bos indicus*, tiene un mayor número de folículos por onda folicular y una mayor sensibilidad en su eje hipotálamo hipofisiario gonadal a la estimulación por aplicaciones de FSH exógena<sup>23</sup>. Según Prieto *et al.* (2006), el tamaño folicular de los *Bos indicus* es menor y esto es un factor adverso para la producción de ovocitos viables para producción de embriones *in vitro*<sup>18</sup>. Sin embargo, los estudios realizados por Bo *et al.* (2003), observaron en el ganado *Bos indicus* tiene un mejor desempeño reproductivo, comparado con los *Bos taurus* en regiones tropicales y subtropicales<sup>4</sup>; esto puede ser un factor que puede influir a que los resultados sean similares en la presente investigación.

### *Porcentaje de embriones in vitro*

En esta investigación se obtuvo como resultado que hubo

diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de embriones producidos *in vitro*, siendo mejor la producción de embriones en la subespecie *taurus* que en la subespecie *Bos indicus*. Este resultado es similar a los reportados por Bryant (2007), donde reportó mejores tasas de desarrollo embrionario en *Bos taurus* que en *Bos indicus*<sup>5</sup>. A su vez difieren de los reportados en el 2010, por Báez *et al.* (2010), donde manifestaron que el ganado con predominancia fenotípica *Bos indicus* presentó mejores tasas de desarrollo embrionario debido a que sus ovocitos son más competentes al tener genes termo tolerantes, con capacidad para resistir las condiciones ambientales del trópico, y que pueden llegar a desarrollarse estos ovocitos luego de la fecundación en mayor porcentaje de embriones que los del ganado *B. taurus*<sup>2</sup>.

Por otro lado, según un estudio realizado por Bryant (2007), los ovocitos de la raza Brahman (*Bos indicus*) presentan una mayor concentración de lípidos comparado con las razas Europeas (*Bos taurus*) lo que resulta en una menor respuesta a la fertilización *in vitro*, por consiguiente menores tasas de preñez<sup>5</sup>. Este mismo autor reportó resultados de la evaluación de los niveles séricos de colesterol y triglicéridos en las hembras donadoras bajo las mismas condiciones dietarias, encontrándose un nivel circulante más elevado de colesterol y de triglicéridos en la raza Brahman (*Bos indicus*) comparada con las razas inglesas

(*Bos taurus*)<sup>6</sup>. Esta mayor circulación de colesterol y triglicéridos afectan directamente la influencia de la cantidad de lípidos encontrados en los ovocitos de ambas subespecies<sup>5,1</sup>; esto podría respaldar la menor tasa de producción de embriones *in vitro*, del ganado *Bos indicus* frente a las razas *Bos taurus*.

Visintin *et al.*, (2002) señalo que existen diferencias ultraestructurales importantes, si se comparan embriones de Nelore (*Bos taurus indicus*) y Holstein Freisian (*Bos taurus taurus*)<sup>24</sup>; y que por estas diferencias existe la posibilidad de una mejor respuesta en la obtención de embriones *in vitro*. Sin embargo existen otros estudios en los cuales no se encontraron diferencia de embriones producidos *in vitro*, sugiriendo que el porcentaje de fertilización *in vitro* no es afectado por la raza o el estado fisiológico<sup>12</sup>. Los resultados encontrados en el presente estudio demuestran que si existe una influencia de la subespecie de la donadora en la cantidad de embriones obtenidos en la fertilización *in vitro*, existen otros factores asociados importantes que se deben tener en cuenta tales como: etapa de producción de la donadora (están en producción láctea o están secas), la temperatura del medio ambiente o estación del año<sup>21</sup>.

Estudios realizados por Camargo *et al.* (2007), compararon la eficacia reproductiva del *Bos indicus* vs *Bos taurus* en ambientes tropicales, frente a la cantidad de embriones obtenidos encontrándose que *Bos indicus* usualmente tienen un mejor desempeño reproductivo en ambientes cálidos que los *Bos taurus taurus*<sup>4</sup>. Este resultado se debe a la mejor adaptación a los ambientes tropicales por parte de las razas indicas, y a la menor resistencia por parte de las razas taurinas al estrés calórico al que son sometidas en los ambientes tropicales<sup>6</sup>.

Con respecto al planteamiento anterior, hay investigaciones como la de Fischer *et al.* (2000), que se refieren a la mayor eficiencia que poseen los ovocitos de vacas de carne para desarrollarse a blastocistos, que aquellos provenientes de vacas lecheras<sup>8</sup>. Del mismo modo, se han encontrado resultados similares, sobre el hecho que el calor afecta la diferenciación embrionaria en vacas Holstein debido también a que se afectan las células foliculares, donde se altera la síntesis de esteroides, haciendo menos competentes a los

ovocitos<sup>5,19</sup>. Los bovinos de la subespecie *Bos indicus* poseen características fisiológicas que ayudan a la regulación de la temperatura corporal evitando así un aumento de esta que pueda afectar los ovarios<sup>3,7,10</sup>.

Sin embargo, en el presente trabajo la temperatura ambiental donde se encontraban las vacas donantes era baja, de alrededor catorce grados centígrados, (temperatura habitual del municipio de San Pedro de los Milagros) donde estaba ubicada la central genética. Por lo tanto las vacas *Bos taurus taurus* presentaron una mejor respuesta a los procesos de fertilización *in vitro*.

Sería un tema a evaluar, el parámetro sanguíneo relacionado con la calidad y el color embrionario, el cual es la proteína sérica total (TP). Estudios, realizados por Oh *et al* (1999), reportaron que niveles altos de TP, se asocian con una mejor calidad y color de los embriones<sup>14</sup>. En estudios realizados por Pereira *et al* (1998), reportaron que las mayores concentraciones de TP se encuentran en hembras con edades entre los 4 y los 10 años de edad<sup>16</sup>.

No obstante, se pueden evaluar varios parámetros para determinar cuál es la hembra donante más adecuada para programas de PIV; entre ellos se pueden mencionar la nutrición y la condición corporal (la cual juega un papel importante en la calidad de los embriones obtenidos)<sup>17</sup>. Igualmente, se ha reportado que algunas vacas son capaces de producir cohortes más viables de folículos, y posteriormente mayor cantidad de complejos cúmulo ovocito, lo que podrá generar una mayor cantidad de embriones producidos *in vitro*, comparadas con otras vacas que no son capaces de producir cohortes foliculares viables<sup>15</sup>.

Los resultados encontrados en el presente trabajo demuestran que las tasas de producción de embriones producidos *in vitro*, puede llegar hacer influenciada por la subespecie de la donante de ovocitos, por factores propios del animal, así como factores climáticos y de confort de los animales que son trabajados para PIV. Se obtuvo que la subespecie *Bos taurus*, generó un mayor porcentaje de producción de embriones *in vitro*, en las condiciones físicas y climatológicas, donde se encuentra la central genética, lo que llevará a una mejor efectividad

en la producción de embriones *in vitro* de esta especie, bajo las condiciones que se mantuvieron realizado el trabajo.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Doctora Natalia Garzón Ruiz, MVZ, por la ayuda prestada para adquirir los datos y los registros necesarios para que esta investigación se hiciera realidad.

## Referencias

1. Adamiak SJ, K Mackie RG, Watt R, Webb KD, Sinclair KD. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biology Reproduction*; 73 (5): 918-926.
2. Báez FJ, Adeymi C, Hernández H, Villamediana P. 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, FCV-LUZ Vol. XX, N° 3, 259 – 267.
3. Bengtsson LP, Whitaker JH. 1998. Farm structures in tropical climates: a textbook for structural engineering and desing. FAO/SIDA Cooperative Programme. Rural structures in east and soth-east Africa. Rome:Food and agriculture organizations. The United Nations.
4. Bo GA, Baruselli PS, Martínez MF. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*; 78 (3-4): 307-326.
5. Bryant BC. 2007. Intracellular lipids in *Bos indicus* and *Bos taurus* oocytes. A post-grade thesis. B.S., Texas A&M University. College Station. 158 pages.
6. Camargo LSA, Viana JHM, Ramos AA, Serapião, De Sa WF, Ferreira AM, et al. 2007. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* diary cows in a tropical environment. *Theriogenology*; 68 (4): 626-632.
7. Carvalho FA, Lammoglia MA, Simoes MJ, Randel RD. 1995. Breed affects thermoregulation and epithelial morphology in imported an native cattle subjected to heat stress. *Journal of Animal Science*; 73 (12): 3570-3573.
8. Fischer AE, Bernal DP, Gutierrez-Robayo C, Rutledge JJ. 2000. Estimates of heterosis for *in-vitro* embryo production using reciprocal crosses in cattle. *Theriogenology*; 54 (9): 1433-1442.
9. Gardon JC, Matas C, Gadea J. 2001. Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosomica. *AN. VET (Murcia)* 17: 19-26.
10. Hansen PJ. 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science*; 82-83: 349-360.
11. Hernández, FH, My, PhD. 2005. Fecundación *In-vitro*. Cátedra de Fisiología de los Animales Domésticos, Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. Maracaibo Venezuela. Manual de Ganadería Doble Propósito.
12. Leroy JLMR, Opsomer G, De Vlieghe S, Vanholder T, Goossens L, et al. 2005. Comparison of embryo quality in high-yeldin diary cows, in diary heifers and in beef cows. *Theriogenology*; 64 (9): 2022-2036.
13. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in-vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*; 41 (1): 62-72.
14. Oh SJ, Yang BS, Park SJ, Im GS, Park YY. 1999. Effect of recipient serum metabolites on pregnancy rate following embryo transfer in Korean native cattle. *Theriogenology*; 51 (1): 268 (abstract).
15. Pereira DC, Dode M, Rumpf R. 2005. Evaluation of different culture Systems on the *in-vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*; 63 (4): 1131-1141.

16. Pereira J, Gutiérrez C, Sánchez J, Berreiro A, Orden M, Garcia-Partida P. 1988. Proteínas Totales: Ferograma, enzimas en bovinos cacerreña, en diferentes edades y en gestación. *Anales Veterinaria*, Vol 4, resumen.
17. Prieto S, F De Sá Filho M, Martinis CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bó GA. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*; 65 (1): 77-88.
18. Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R, Wolfenson D, et al. 2001. Delayed effect of heat stress on steroid production in médium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*; 121: 745-751
19. Salazar, R, Gaviria, B, Tamayo, P 1997. Estudio de la infertilidad bovina en las zonas lecheras de Antioquia. Municipio San Pedro de los Milagros (Antioquia). Informe final Universidad de Antioquia, 15 pag.
20. Satori R, Sartor-Bergfelt R, Guenther JN, Parrish JJ, Wilthbank MC. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*; 85 (11): 2803-2812.
21. Tobón J, 2004. Repoblamiento ganadero. EDITORIAL MARIN VIECO LTDA
22. Van Wagtendonk de Leeuw AM. 2006. Ovum Pick-Up and *in-vitro* Production in the bovine alter several generations: a 2005 status. *Theriogenology*; 65 (5): 914-925.
23. Visintin JA, Martinus JF, Bevilacqua EM, Mello MR, Nicacio AC, A ssumpcao ME. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology*; 57 (1): 345-359.