

## **Implementación de la técnica de producción de embriones in vitro en ovinos en Costa Rica**

## **Implementation of the in vitro embryo production technique in sheep in Costa Rica**

## **Implementação da técnica de produção de embriões in vitro em ovelhas na Costa Rica**

Natalia Soto Barrientos  
Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica  
ROR:<https://ror.org/01t466c14>  
Contacto: [natalia.soto.barrientos@una.ac.cr](mailto:natalia.soto.barrientos@una.ac.cr)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1540-0563>

Marcela Suárez Esquivel  
Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica  
ROR:<https://ror.org/01t466c14>  
Contacto: [marcela.suarez.esquivel@una.ac.cr](mailto:marcela.suarez.esquivel@una.ac.cr)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9174-2656>

Laura Castro Ramírez  
Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica  
ROR:<https://ror.org/01t466c14>  
Contacto: [laura.castro.ramirez@una.ac.cr](mailto:laura.castro.ramirez@una.ac.cr)  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-4635-336X>

Recibido 04-02-2025      Revisado 12-04-2025      Aceptado 17-09-2025

## Resumen

El departamento de Reproducción Animal de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica implementó la técnica de producción de embriones ovinos *in vitro*. Se colectaron 341 óvulos a partir de 63 ovarios obtenidos de planta de cosecha y transportados al laboratorio en durante la hora posterior al sacrificio. Los folículos fueron aspirados en tubos con medio de colecta de óvulos (OPU, Bioscience®) y los óvulos con al menos una capa completa de células del cúmulus (216/341) fueron colocados en medio de maduración (IVM, Bioscience®) e incubados a 38.8°C por 22-24 h, en atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5%. El 91.20% (197/216) de los óvulos madurados con buena expansión del cúmulus y citoplasma homogéneo, fueron fecundados con 1-2 ×10<sup>6</sup>/ml de semen en medio de fertilización (IVF, Bioscience®) por 16-22 h. Seguidamente, los cigotos fueron desnudados, transferidos a medio de cultivo (IVC, Bioscience®), e incubados en una atmósfera con baja presión de oxígeno. Después de 24 h de cultivo, la tasa de división celular (clivaje) fue 57.36% (113/197). A los 7 días de cultivo la tasa de blastocistos fue 20.81% (41/197) en relación con los óvulos con adecuada maduración y 36.28% (41/113) en relación de los óvulos fecundados (clivaje). Este estudio es un primer paso crucial hacia la producción de embriones ovinos en Costa Rica, y abre nuevas oportunidades para potenciar la mejora genética y productiva de pequeños rumiantes. Además, fortalece la formación académica y el desarrollo de investigaciones estratégicas para solventar necesidades prioritarias del sector agropecuario nacional.

**Palabras clave:** ovino, óvulo, embriones, blastocistos, *in vitro*

## Abstract

In this study, the ovine embryo production technique with *in vitro* fertilization was implemented in the Animal Reproduction Department of the Veterinary Medicine School, Universidad Nacional, Costa Rica (UNA). A total of 63 ovaries were collected from slaughterhouse's ovaries, which were transported within



one hour to the Veterinary Medicine school. The follicles were aspirated by using oocyte collection medium (OPU, Bioscience®), and oocytes surrounded by at least one complete layer of cumulus cells were selected (216/341), placed in maturation medium (IVM, Bioscience®) and incubated at 38.8°C during 22 to 24 h, in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The 91.2% (197/216) of the matured oocytes that showed good cumulus expansion and homogeneous cytoplasm, were fertilized with 1-2 × 10<sup>6</sup>/ml semen in fertilization media (IVF, Bioscience®) during 16-22 h. The zygotes were denuded and transferred to culture medium (IVC Bioscience®) and a low oxygen atmosphere. After a 24 h culture, the cleavage rate was 57.36% (113/197). After 7 days of culture, the blastocysts rate was 20.81% (41/197) in relationship to the matured oocytes, and 36.28% (41/113) according to the cleaved zygotes.

Our results are a first step towards the application of sheep *in vitro* embryo production in Costa Rica. Its importance lies on its potential to promote genetic and productive enhancement in small ruminants but also contributes to educational and training purposes that bring new research opportunities aimed to solve local needs.

**Key words:** ovine, oocyte, embryos, blastocysts, *in vitro*

## Resumo

O Departamento de Reprodução Animal da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Nacional da Costa Rica implementou a técnica de produção de embriões ovinos *in vitro*. Foram coletados 341 óvulos a partir de 63 ovários obtidos em um matadouro e transportados ao laboratório dentro de uma hora após o abate. Os folículos foram aspirados em tubos contendo meio de coleta de óvulos (OPU, Bioscience®) e os óvulos com pelo menos uma camada completa de células do cúnulo (216/341) foram colocados em meio de maturação (IVM, Bioscience®) e incubados a 38,8°C por 22 a 24 horas, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Do total, 91,20% (197/216) dos óvulos maturados, que apresentaram boa expansão do cúnulo e citoplasma homogêneo, foram fecundados com 1-2 × 10<sup>6</sup>/ml de sêmen em meio de fertilização (IVF, Bioscience®) por 16 a 22 horas. Em seguida, os zigotos foram desnudos, transferidos para meio de



cultivo (IVC, Bioscience®) e incubados em uma atmosfera com baixa pressão de oxigênio. Após 24 horas de cultivo, a taxa de divisão celular (clivagem) foi de 57,36% (113/197). Após sete dias de cultivo, a taxa de blastocistos foi de 20,81% (41/197) em relação aos óvulos com maturação adequada e de 36,28% (41/113) em relação aos óvulos fecundados (clivados). Este estudo representa um passo crucial para a produção de embriões ovinos na Costa Rica e abre novas oportunidades para impulsionar a melhoria genética e produtiva de pequenos ruminantes. Além disso, fortalece a formação acadêmica e o desenvolvimento de pesquisas estratégicas voltadas para atender às necessidades prioritárias do setor agropecuário nacional.

**Palavras-chave:** ovino, óvulo, embriões, blastocistos, *in vitro*

## Introducción

El VI Censo Nacional Agropecuario, 2014, estimó la distribución de la población de pequeños rumiantes en Costa Rica en 1 792 fincas con 35 800 ovinos y 2 348 fincas con 12 852 caprinos (INEC, 2015), evidenciando un crecimiento importante del sector en comparación con el censo previo del 2006 (Maroto et al., 2011). Sin embargo, como consecuencia de las regulaciones sanitarias impuestas a la importación de material genético en Costa Rica, la mejora genética de esta población fue limitada durante varios años, lo que ha resultado en individuos pequeños y poco productivos. A raíz del crecimiento del sector y de la presión de los productores, las autoridades competentes facilitaron la apertura y la aprobación de protocolos que permiten la importación de semen y embriones de pequeños rumiantes provenientes de varios países (SENASA, 2017).

La habilitación legal de importación de material genético de animales genéticamente superiores abrió la posibilidad de implementar técnicas de reproducción asistida (TRA), que potencian las tasas de éxito y la posibilidad de obtener mayor número de individuos y más productivos. Las TRA presentan ventajas tales como: (i) poder reproducir individuos que por diversas razones ya no pueden ser reproducidos naturalmente, (ii) reducir el intervalo generacional y (iii) obtener un mayor número de hijos de hembras de alta calidad genética a un menor costo (Naitana y Ledda, 2020).

Algunas razas ovinas, incluso en condiciones tropicales, presentan patrones de reproducción estacionales (Arroyo, 2011). En este contexto, las TRA se han convertido en una herramienta clave para superar estas limitaciones y potenciar el mejoramiento genético. Estas técnicas permiten su aplicación en hembras seniles, prepúberes y preñadas, además de que la colecta de óvulos puede realizarse inclusive sin necesidad de hormonas externas (Souza-Fabjan et al., 2021). Esto ha generado un creciente interés en la implementación de la producción *in vitro* de embriones (PIVE) y su criopreservación (Paramio & Izquierdo, 2014). Después de la inseminación artificial, estas han demostrado tener el mayor impacto en los programas reproductivos y de mejoramiento genético a nivel mundial (Souza-Fabjan et al., 2014).

En comparación con los bovinos, la innovación e implementación de tecnologías de reproducción asistida en pequeños rumiantes ha sido más limitada. No obstante, investigaciones realizadas en torno a estos animales han destacado su importancia en el desarrollo económico acelerado de países asiáticos y su creciente uso, especialmente en cabras, como modelos para la producción de proteínas recombinantes en la leche (Paramio & Izquierdo, 2016).

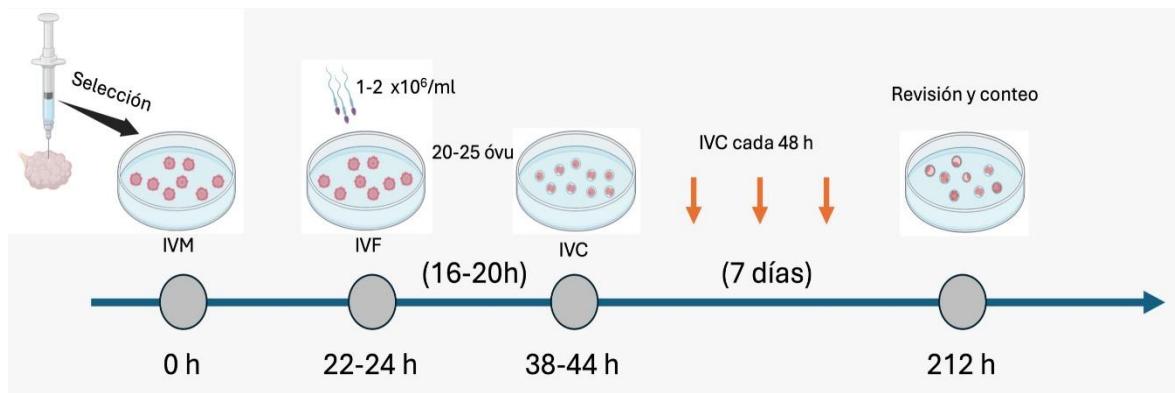
Lamentablemente, los precios de las pajillas de semen son elevados y ciertos procedimientos, como la transferencia de embriones y la recuperación de óvulos para fertilización *in vitro*, requieren el uso de equipo laparoscópico, lo cual no solo implica costos más elevados en materiales, sino contar con personal capacitado para la manipulación apropiada de los animales y el equipo. Por ende, si bien se ha dado la apertura para la importación de material genético, su elevado costo económico no ha facilitado el avance genético deseado.

En consecuencia, a través de este estudio, la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV) de la Universidad Nacional de Costa Rica implementó la técnica de PIVE en pequeños rumiantes, iniciando con ovinos como modelo experimental, con el fin de colaborar con el sector productivo, fomentar los procesos académicos vinculados con estas especies, servir como entidad de apoyo a productores y médicos veterinarios, y abrir un nicho que potencie la mejora genética de los animales de este sector productivo en nuestro país.

### Metodología

Para el estudio, se utilizaron ovarios de ovejas prepúberes provenientes de plantas de cosecha. Los animales pertenecían a distintas razas, incluyendo White Dorper, Katahdin, Hampshire y diversos cruces. Los ovarios fueron extraídos post-mortem y transportados en solución salina a temperatura ambiente (24-28°C) al laboratorio de Fertilización *in vitro* de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional dentro de la primera hora posterior a la colecta.

Los protocolos de fertilización *in vitro* se pueden resumir en procesos principales, que están acordes en cuanto a etapas y duración con el que es utilizado por Hansen et al. (2023), Figura 1.



**Figura 1.** Etapas del protocolo de producción de embriones *in vitro* a partir de la aspiración de óvulos. Fuente: elaboración propia. Fuente: elaboración propia.

En el laboratorio, los óvulos se recuperaron mediante aspiración con presiones que oscilaron entre 50 y 80 mmHg y con un pequeño volumen de medio de colecta OPU (Bioscience®) en el tubo recolector. Una vez colectado el fluido, se procedió a revisarlo al estereoscopio para aspirar los óvulos, los cuales se lavaron con el medio de lavado Wash (Bioscience®) y se seleccionaron de acuerdo con la cantidad de células del cúmulus rodeando al óvulo, considerando que al menos tuvieran una capa externa completa y citoplasma homogéneo para ser considerados viables (Souza-Fabjan et al., 2016).

Los óvulos seleccionados se colocaron en platos de Petri con gotas de medio de maduración IVM (Bioscience®), cubiertas con aceite (Sage®). Luego, se incubaron (Steri-cycle i160, Thermo Scientific®) durante 22-24 horas bajo condiciones controladas de humedad (> 93%), 5% de CO<sub>2</sub> y 38.8°C de temperatura.

A las 24 h solamente los óvulos cuyo cúmulo presentó una expansión correspondiente a al menos el doble de la del óvulo fueron considerados como maduros (Mondal et al., 2019), junto con un citoplasma homogéneo, fueron transferidos a gotas de medio de fertilización IVF (Bioscience®). Previo a la fertilización, se descongeló una pajilla de semen de un macho Katahdin, con morfología normal del 90%, vigor 5 y una motilidad post descongelamiento de 75%. Los espermatozoides se prepararon mediante gradientes de densidades de 80% y 40% (PureCeption™, Sage®) y se lavaron con medio Sperm Talp (Bioscience®).

En cada gota de IVF se colocaron de 20 a 25 óvulos y una concentración de semen  $1-2 \times 10^6/\text{ml}$  de espermatozoides. Se verificó en el borde de cada gota que los espermatozoides presentaran motilidad progresiva y concentración óptima. El cocultivo de los óvulos con los espermatozoides se mantuvo por 16-20h, bajo condiciones de humedad, 5% de CO<sub>2</sub> y a 38.8°C de temperatura. Tras la fertilización, los cigotos fueron lavados y desnudados de las células del cúmulo mediante pipeteo con una pipeta Stripper de 200 µm de diámetro. Posteriormente, se transfirieron a gotas con medio de cultivo IVC (Bioscience®), cubiertas con aceite y fueron incubados durante 7 días bajo condiciones controladas de humedad, 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y a 38.8°C de temperatura. Las gotas fueron suplementadas con medio nuevo cada 48 horas. En el día 7 se realizó la revisión y conteo de los blastocitos presentes.

## Resultados y discusión

En este estudio se aspiraron los folículos de un total de 63 ovarios recolectados de ovejas prepúberes. Se obtuvo un total de 341 óvulos, con un promedio de 5.41 óvulos por ovario, de los cuales 216 fueron considerados viables. Estos fueron utilizados en los ensayos de fertilización in vitro.

Después de 22-24 horas de cultivo en medio de maduración, se obtuvo un porcentaje de óvulos con expansión adecuada del cúmulo y citoplasma homogéneo del 91.2% (197/216).

Tras 16-22 horas de cocultivo con espermatozoides, se determinó una tasa de clivaje de 57.36% (113/197) de los ovocitos con maduración adecuada del total de óvulos fecundados. Finalmente, pasados 7 días de cultivo, se determinó una tasa de obtención de blastocitos de 20.81% (41/197) de los óvulos madurados, que corresponde a un 36.28% (41/113) de los cigotos que presentaron clivaje. El detalle de los resultados se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Detalle de los resultados de la obtención de óvulos a partir de ovarios colectados en plantas de cosecha de ovejas. Fuente: elaboración propia.

Tipo de estructura	Cantidad
Ovarios aspirados	63
Óvulos totales colectados	341
Óvulos aspirados por ovario	5.41
Óvulos viables seleccionados para maduración	216
Óvulos con buena maduración seleccionados para fecundación	197

En términos generales, se reporta que entre el 70% y 90% de los óvulos inmaduros logran alcanzar la metafase II en condiciones de maduración in vitro

(Souza Fabjan et al., 2021), lo que concuerda con el porcentaje obtenido en este estudio (91.20%). Ahora bien, es importante tener presente que cuando se trabaja con óvulos de matadero en comparación con óvulos procedentes de hembras adultas, colectados por laparoscopía (LOPU), las tasas de clivaje y de blastocistos tienden a ser inferiores, muy variables e inconstantes (Souza Fabjan et al. 2014). Los óvulos colectados de ovarios de matadero suelen provenir de hembras prepúberes de diferentes razas, que suele resultar en óvulos con menor competencia para madurar y ser fecundados, dado que es más factible que provengan de folículos inmaduros en diferentes estados de desarrollo (Leoni et al., 2015). En mamíferos, la competencia de los óvulos para poder reanudar adecuadamente la maduración meiótica suele ir de la mano con el crecimiento de los folículos (Mermillod et al., 2008). Los óvulos maduros, además de contar con la capacidad de alcanzar la metafase II, deben haber sufrido procesos citoplásmicos que se asocian con su capacidad de sobrellevar adecuadamente los procesos vinculados con la fecundación, así como la expansión y eventual pérdida de las células del cúmulo (Sen & Caiazza, 2013). En consecuencia, los resultados de la maduración *in vitro* dependen en gran medida de que las condiciones de cultivo simulen de mejor manera el desarrollo folicular hasta la ovulación (Souza Fabjan et al., 2014), situación que aún no se logra en su totalidad, por lo que su capacidad de maduración es menor a la de oocitos obtenidos *in vivo* (Khatun et al., 2011). No obstante, la utilización de este tipo de material, además de ser barato, es esencial para poder establecer y estandarizar la técnica, pues permite reducir la utilización de animales en producción, máxime que la obtención *in vivo* de óvulos en ovinos implica la realización de procedimientos quirúrgicos o laparoscópicos, reduciendo además la capacidad de repetición del proceso para efectos experimentales (Teixeira et al., 2011). Otro factor importante, es que actualmente se está trabajando en perfeccionar la técnica de cultivo de óvulos de hembras prepúberes, debido al enorme potencial de reducción del intervalo generacional que esto conlleva, maximizando la dispersión genética de hembras de calidad superior (Izquierdo et al., 2019).

Sumado a lo anterior, el detalle del clivaje y la producción de embriones ovinos se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Porcentajes obtenidos en los ensayos de producción de embriones in vitro en ovinos a partir de ovarios recolectados en plantas de cosecha de hembras prepúberes. Fuente: elaboración propia.

Tipo de estructura	Relación	Porcentaje
Maduración de óvulos	197/216	91.20
Clivaje a partir de los óvulos con buena maduración	113/197	57.36
Blastocistos obtenidos a partir de los óvulos con buena maduración	41/197	20.81
Blastocistos a partir de los óvulos fecundados (clivaje)	41/113	36.28

En pequeños rumiantes se reportan tasas de clivaje promedio entre 50% y 80% (Souza Fabjan et al., 2021). Los valores obtenidos en nuestro estudio (57.36%) se enmarcan en ese rango, que también está acorde con el de otros estudios, como el de Mishra et al. (2016), que documenta valores entre 38.58% y 67%. La tasa de clivaje es importante porque refleja no solamente la cantidad óvulos fecundados, sino que es un fuerte indicador de la calidad del embrión y, por tanto, es un criterio adicional en la selección de embriones para transferencia con el fin de aumentar las tasas de gestación (Fu et al., 2009).

Sumado a lo anterior, en términos generales se reportan tasas de obtención de blastocistos a partir de ovocitos de hembras adultas entre 25% y 50%, tanto en cabras como en ovejas (Souza Fabjan et al., 2021). En este estudio las tasas de obtención de blastocistos fueron de 20.81% en relación con los óvulos maduros, y de 36.28% en relación con los cigotos que presentaron clivaje. Nuevamente, es preciso tener presente que en nuestro estudio usamos óvulos de hembras prepúberes, además, diversos autores reportan tasas de clivaje similares utilizando óvulos de plantas de cosecha, entre 21 a 30.8% de los óvulos madurados in vitro (Shabanrareh y Zandi, 2010; Cocero et al., 2011). Respecto a las tasas de obtención de blastocistos en relación con las estructuras que presentaron clivaje, partiendo de ovarios colectados en plantas de cosecha, diversos autores reportan valores similares a los nuestros, tales como Shabankareh et al. (2012) que reporta valores entre 16 y 45%.

## Conclusiones

Es evidente que se requiere un mayor esfuerzo para optimizar el rendimiento de la técnica, ya que aún enfrentamos factores que han limitado su difusión a gran escala. Entre ellos, la variabilidad en la calidad y cantidad de los óvulos colectados, lo que genera inconsistencias en los resultados reportados por distintos laboratorios. No obstante, la implementación y estandarización de esta técnica es fundamental, ya que abre un abanico de oportunidades para potenciar el mejoramiento genético en esta especie dentro del país.

En este sentido, este proyecto representa un primer paso en la producción de embriones in vitro en pequeños rumiantes en Costa Rica, contribuyendo al crecimiento del sector, así como la mejora de la calidad genética y la productividad. Asimismo, refuerza el compromiso de la institución con el desarrollo de investigaciones adaptadas a nuestras condiciones y la formación de profesionales en esta área.

## Referencias

- Arroyo, J. (2011). Reproductive seasonality of sheep in Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 829-84. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-04622011000300001&script=sci\\_abstract&tlang=en](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-04622011000300001&script=sci_abstract&tlang=en)
- Fu, J., Wang, X. J., Wang, Y. W., Sun, J., Gemzell-Danielsson, K., & Sun, X. X. (2009). The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(8), 437-441. <https://doi.org/10.1007/s10815-009-9342-6>
- Hansen, P. J., Maia, T., & Rivera, R. (2023). *In vitro production of bovine embryos*. Dept. of Animal Sciences, Bovine Embryo Lab, University of Florida. Retrieved November 6, 2024, from <https://animal.ifas.ufl.edu/media/animalifasufledu/hansen-lab-website/lab-protocols/Laboratory-Guide-for-Production-of-Bovine-Embryos-In-Vitro-ver-06.28.2023.pdf>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2015). *VI Censo Nacional Agropecuario*. [https://admin.inec.cr/sites/default/files/media/reagropeccenagro2014-002\\_0\\_3.pdf](https://admin.inec.cr/sites/default/files/media/reagropeccenagro2014-002_0_3.pdf)



Izquierdo, D., Catalá, M. G., & Paramio, M. T. (2019). Small ruminants: Prepubertal oocyte donors. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2006, pp. 155-163). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0_11)

Khatun, M., Bhuiyan, M. M., Ahmed, J. U., Haque, A., Rahman, M. B., & Shamsuddin, M. (2011). In vitro maturation and fertilization of prepubertal and pubertal black Bengal goat oocytes. *Journal of Veterinary Science*, 12(1), 75-82. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.1.75>

Leoni, G. G., Palmerini, M. G., Satta, V., Succu, S., Pasciu, V., Zinelli, A., Carru, C., Macchiarelli, G., Nottola, S. A., Naitana, S., & Berlinguer, F. (2015). Differences in the kinetic of the first meiotic division and in active mitochondrial distribution between prepubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep model. *PLoS ONE*, 10(4), e0124911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124911>

Maroto, R., Jiménez, A. E., Romero, J. J., Álvarez, V., De Oliveira, J. B., & Hernández, J. (2011). First report of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep from Costa Rica. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1-4. <https://doi.org/10.4061/2011/145312>

Mermillod, P., Dalbies-Tran, R., Uzbekova, S., Thelie, A., Traverso, J. M., & Perreau, C., et al. (2008). Factors affecting oocyte quality: Who is driving the follicle? *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 393-400. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01190.x>

Mishra, A., Reddy, I. J., Gupta, P. S. P., & Mondal, S. (2016). Developmental regulation and modulation of apoptotic genes expression in sheep oocytes and embryos cultured in vitro with L-carnitine. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 1020-1029. <https://doi.org/10.1111/rda.12789>

Mondal, S., Mor, A., Reddy, I. J., Nandi, S., Gupta, P. S. P., & Mishra, A. (2019). In vitro embryo production in sheep. In J. R. Herrik (Ed.), *Comparative Embryo Culture* (pp. 131-140). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0_9)

Naitana, S., & Ledda, S. (2020). Reproductive technologies in sheep. In G. A. Presicce (Ed.), *Reproductive Technologies in Animals*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817107-3.00003-5>

Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2016). Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology*, 86(1), 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.027>

Sen, A., & Caiazza, F. (2013). Oocyte maturation: A story of arrest and release. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*, 5(2), 451-477. <https://doi.org/10.2741/S383>

Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA). (2017). Requisitos sanitarios para importación de semen, embriones y óvulos (DCA-PG-006). Retrieved from file:///C:/Users/FIV-REPRODUCCION-EMV/Dropbox/PC%20(2)/Downloads/Guia%20Importacion%20DCA-2.pdf

Shabankareh, H. K., Kafilzadeh, F., & Soltani, L. (2012). Treatment of ovine oocytes with certain water-soluble vitamins during in vitro maturation (IVM). *Small Ruminant Research*, 104, 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.050>

Shabankareh, H. K., & Zandi, M. (2010). Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *Fertility and Sterility*, 94, 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.160>

Souza-Fabjan, J. M. G., Batista, R. I. T. P., Correia, L. F. L., Paramio, M. T., Fonseca, J. F., Freitas, V. J. F., & Mermilliod, P. (2021). In vitro production of small ruminant embryos: Latest improvements and further research. *Reproduction, Fertility, and Development*, 33(2), 31-54. <https://doi.org/10.1071/RD20206>

Souza-Fabjan, J. M. G., Locatelli, Y., Duffard, N., Corbin, E., Batista, R. I. T. B., Freitas, V. J. F., Beckers, J. F., & Mermilliod, P. (2016). Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for in vitro embryo production. *Theriogenology*, 86(8), 1989-1998. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.06.021>

Souza-Fabjan, J. M. G., Panneau, B., Duffard, N., Locatelli, Y., Figueiredo, J. R., de Figueirêdo Freitas, V. J., & Mermilliod, P. (2014). In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology*, 81, 1149-1162. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.001>

Teixeira, P. P., Padilha, L. C., Oliveira, M. E., Motheo, T. F., da Silva, A. S., & Barros, F. F. (2011). Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*, 127(1-2), 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.08.001>